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

Extração da Pró-toxina Épsilon e de uma Protease a partir
de *Clostridium perfringens* em Sistemas de Duas Fases
Aquosas Utilizando PEG/Citrato

Tatiana Souza Porto

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior

São Paulo
2004

Tatiana Souza Porto

Extração da Pró-toxina Épsilon e de uma Protease a partir de
Clostridium perfringens em Sistemas de Duas Fases Aquosas
Utilizando PEG/Citrato

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior
orientador/presidente

Prof^a. Dr^a. Inês Conceição Roberto
1º. examinador

Prof^a Dr^a Cristina Northfleet de Albuquerque
2º. examinador

São Paulo, 31 de Agosto de 2004.

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

P853c Porto, Tatiana Souza
Extração da pró-toxina Épsilon e de uma protease a partir
de *Clostridium perfringens* em sistemas de duas fases aquosas
utilizando PEG/Citrato / Tatiana Souza Porto. – São Paulo,
2004.
87p.

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

Orientador: Pessoa Junior, Adalberto

1. Biotecnologia 2. Microbiologia industrial 3. Enzimologia
industrial I. T. II. Pessoa Junior, Adalberto, orientador.

620.8 CDD

*Aos meus Pais, Everaldo e Maria das Graças,
às minhas irmãs Maria Carolina e Camila, a minha
sobrinha Amanda, e ao meu cunhado Jay com todo
meu carinho.*

A Fábio, meu namorado, com meu amor.

"É ocioso pensar sobre o justo e o injusto, o certo e o errado e os feitos passados. O útil é analisar, e se possível extrair uma lição para o futuro".

(Gandhi)

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior que é um excelente orientador e me incentivou durante os dois anos de mestrado. Ressalto a minha admiração e agradeco pela confiança depositada em mim, que me fez crescer bastante tanto pessoal como profissionalmente.

À Prof^ª Dr^ª Ana Lúcia Figueiredo Porto, pela oportunidade e incentivo dados para o ingresso na pesquisa científica e pelas orientações durante os dois anos de mestrado. Obrigada pelo carinho, amizade, incentivo que tanto colaboraram para a realização deste trabalho.

À Doutoranda Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares, amiga e companheira de todas as horas, por tudo o que passamos trabalhando e batalhando pela sua tese e ao mesmo tempo pelo meu mestrado.

Ao Prof. Dr. Benício Barros Neto, pela paciência, atenção, disponibilidade e bom humor para analisar estatisticamente os dados deste trabalho, além da competência que é indiscutível. Os meus mais sinceros agradecimentos.

Ao Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho, Diretor do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA por possibilitar o desenvolvimento do trabalho com a infra-estrutura deste grande laboratório.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelos recursos financeiros e pela bolsa concedida.

Às amigas, em especial à Ana Carolina, Ana Cecília, Alziana, Ayla, Catarina, Daniele, Juliana, Mariana, Michaelle, Sibebe, Teodora, Veruska e Vanessa, pela força, carinho e amizade dados durante esta fase.

Aos colegas do LIKA, Keila, Daniela, Alessandro, Renata e Edney. Obrigada pelo carinho e incentivo.

Aos colegas do Laboratório da USP, Ângelo, Carlota, Ester, André e Luiz Carlos. Obrigada pelo acolhimento e pela força dados durante o tempo que permaneci em São Paulo.

Agradeço por tudo e a todos que me ajudaram de alguma forma neste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	2
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	5
RESUMO	6
ABSTRACT	7
I - INTRODUÇÃO	8
II -REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
II. 1- <i>Clostridium perfringens</i>	10
II. 1.1- Pró-toxina Épsilon.....	12
II.1.2 -Tripsina.....	14
II. 2-Purificação de proteínas	14
II. 3- Sistema de Duas Fases Aquosas (SDFA)	15
II. 3.1-Diagrama de fases do sistema de duas fases aquosas.....	16
II. 3.2- Polietileno glicol.....	18
II. 3.3- Variáveis que influenciam o sistema de duas fases aquosas.....	18
II. 3.4- Massa molar e concentração do polímero.....	19
II. 3.5- Tipo de cátion e pH.....	20
II. 3.6- Adição de sais.....	21
II. 3.7- Temperatura.....	22
II. 3.8- Adição de suspensões biológicas.....	23
II. 4- Sistemas de duas fases aquosas compostos de PEG/sais	24
II. 5- Polímeros alternativos para extração em SDFA	25
II. 6- Aplicação de planejamentos experimentais em SDFA	25
III-OBJETIVOS	27
III. 1-Objetivo geral	27
III. 2-Objetivos específicos	27
IV-MATERIAIS	28
IV.1 - Obtenção da pró-toxina épsilon	28
IV.2 -Reagentes utilizados	28
V. MÉTODOS	29
V.1 - Estabilidade das biomoléculas frente às variações de pH e temperatura em função do tempo.	29
V. 2-Construção das Curvas Binodais	30
V. 3-Extração líquido-líquido em Sistemas de Duas Fases Aquosas	31
V. 4-Planejamento fracionário para extração da pró-toxina épsilon em SDFA	32
V. 5-Planejamento experimental para extração da protease (tripsina) em SDFA	34
V. 6-Determinação do conteúdo protéico	35
V. 7-Determinação da atividade biológica da pró-toxina épsilon	36
V. 8-Determinação da atividade proteásica	37
VI-METODOLOGIA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS	38
VI. 1-Aumento de pureza (AP)	38
VI. 2-Recuperação em atividade (REC)	38
VI. 3-Coeficiente de Partição (K)	39
VI. 4-Balanco de Massa/ Atividade Biológica	39
VII - RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
VII. 1- Efeito do pH e da temperatura na estabilidade da pró-toxina épsilon	40
VII. 2-Curvas Binodais PEG/citrato utilizando água	42
VII.3-Curvas binodais PEG/Citrato utilizando meio fermentado com pró-toxina épsilon	46

VII. 4-Extração da pró-toxina épsilon pelo sistema de duas fases aquosas	48
VII. 5 -Extração da protease (tripsina) em sistemas de duas fases aquosas (SDFA) ...	54
VII. 6 - Estabilidade da protease à temperatura e ao pH em função do tempo.	75
VIII – CONCLUSÕES	79
IX- PUBLICAÇÕES GERADAS A PARTIR DA DISSERTAÇÃO	80
X-REFERÊNCIAS	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Diagrama de fases genérico para um sistema contendo PEG/sal.	17
Figura 2 – Fluxograma dos experimentos de estabilidade frente às variações de pH e temperatura em função do tempo.	29
Figura 3 – Esquema da metodologia da construção das curvas binodais.....	30
Figura 4 – Esquema da rotina de ensaios da extração de duas fases aquosas.	31
Figura 5- Curva de estabilidade ao pH da pró-toxina épsilon presente no meio fermentado, realizada a temperatura de 5°C.....	40
Figura 6 - Curva de estabilidade térmica da pró-toxina épsilon presente no meio fermentado no pH 7,0.	41
Figura 7 - Curva binodal para o sistema PEG 8000/citrato de sódio a pH 6,0.....	43
Figura 8 - Curva binodal para o sistema PEG 3350/Citrato de sódio a pH 6,0.....	43
Figura 9 - Curva binodal para o sistema PEG 400/Citrato de sódio com água em diferentes valores de pH e temperatura de 26°C ± 1°C.....	45
Figura 10 - Curva binodal para o sistema PEG/citrato de sódio a pH 6,0 com água em diferentes massas molares de PEG e temperatura de 26°C ± 1°C.....	46
Figura 11 - Curvas binodais relacionando as massas molares do PEG das curvas preparadas com água e as com meio fermentado contendo a pró-toxina épsilon a pH 6,0 a temperatura de 26° C ± 1° C.	47
Figura 12 - Curvas binodais dos sistemas utilizados no planejamento experimental fracionário com as massas molares de PEG (400, 3350 e 8000g/mol) e valores de pH (6,0; 7,0 e 8,0) a temperatura de 26° C ± 1° C. ▲ - pontos do planejamento experimental.	49
Figura 13 - Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável-resposta a recuperação da pró-toxina épsilon na fase superior do sistema de duas fases aquosas, utilizando 8 variáveis em dois níveis. Os significados dos símbolos na ordenada da figura são: (A)MMPEG- massa molar do PEG, (B)CPEG- concentração do PEG, (C)Citrato- concentração de citrato, (D)pH- valor de pH, (E)NaCl- concentração de NaCl, (F)F Diluição- Fator de diluição do meio fermentado, (G)Temperatura- temperatura de extração e (H)MTS- massa total do sistema.....	52
Figura 14 - Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável de resposta o aumento de pureza da pró-toxina épsilon na fase superior do sistema de duas fases aquosas, utilizando 8 variáveis em dois níveis. Os significados dos símbolos na ordenada da figura são: (A)MMPEG - massa molar do PEG, (B)CPEG - concentração do PEG, (C)Citrato - concentração de citrato, (D) pH- valor de pH, (E)NaCl - concentração de NaCl, (F)F.Diluição - fator de diluição do meio fermentado, (G)Temperatura- temperatura de extração e (H)MTS- massa total do sistema.	53
Figura 15 - Representação gráfica tridimensional da relação entre as respostas: coeficiente de partição (valores em logaritmo), aumento de pureza e recuperação da pró-toxina épsilon na fase superior do sistema.	54

Figura 16 - Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável-resposta o coeficiente de partição, utilizando 4 variáveis em dois níveis e um erro igual a 0,004. Os significados dos símbolos na ordenada da figura são: (A)MMPEG- massa molar do PEG, (B)CPEG- concentração do PEG, (C) pH- valor de pH, (D)Citrato- concentração de citrato.....	56
Figura 17 – Gráfico cúbico das variáveis (concentração de citrato, concentração de PEG, massa molar do PEG e pH no ponto central) em função da resposta coeficiente de partição.....	57
Figura 18 - Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável-resposta a recuperação, utilizando 4 variáveis em dois níveis. Os significados dos símbolos na ordenada da figura são: (A)MMPEG- massa molar do PEG, (B)CPEG- concentração do PEG, (C) pH- valor de pH, (D) Citrato- concentração de citrato.....	58
Figura 19 – Diagrama para interpretação geométrica dos efeitos de um planejamento 2^4 , tendo como variável-resposta a recuperação para analisar a concentração de citrato em função da massa molar do PEG.....	59
Figura 20 - Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável-resposta o aumento de pureza, utilizando 4 variáveis em dois níveis e um erro igual a 0,090. Os significados dos símbolos na ordenada da figura são: (A)MMPEG- massa molar do PEG, (B)CPEG- concentração do PEG, (C) pH- valor de pH, (D) Citrato- concentração de citrato.....	60
Figura 21 – Diagrama para interpretação geométrica dos efeitos de um planejamento 2^4 , tendo como variável-resposta o aumento de pureza para analisar a concentração de citrato em função da massa molar do PEG.....	61
Figura 22 – Distribuição dos sistemas de extração em relação ao AP e REC na fase superior.....	62
Figura 23 - Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável-resposta o coeficiente de partição, utilizando 4 variáveis em dois níveis e um erro igual a 0,006. Os significados dos símbolos na ordenada da figura são: (A)MMPEG- massa molar do PEG, (B)CPEG- concentração do PEG, (C) pH- valor de pH, (D) Citrato- concentração de citrato.....	64
Figura 24 - Gráfico cúbico das variáveis (concentração de citrato, concentração de PEG, massa molar do PEG e pH no ponto central) para a resposta coeficiente de partição.....	65
Figura 25 – Representação gráfica das respostas aumento de pureza e recuperação para a extração em sistemas de duas fases aquosas.....	66
Figura 26 – Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável-resposta a recuperação, utilizando 4 variáveis em dois níveis. Os significados dos símbolos na ordenada da figura são: (A)MMPEG- massa molar do PEG, (B)CPEG- concentração do PEG, (C) pH- valor de pH, (D) Citrato- concentração de citrato.....	67
Figura 27 - Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável-resposta o aumento de pureza, utilizando 4 variáveis em dois níveis. Os significados dos símbolos na ordenada da figura são: (A)MMPEG- massa molar do PEG, (B)CPEG- concentração do PEG, (C) pH- valor de pH, (D) Citrato- concentração de citrato.....	68
Figura 28 - Gráfico cúbico das variáveis (concentração de citrato, concentração de PEG e massa molar do PEG) para a resposta aumento de pureza.....	68
Figura 29 – Representação gráfica do aumento de pureza em relação à concentração de citrato e massa molar do PEG.....	69
Figura 30 - Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável-resposta o coeficiente de partição, utilizando 3 variáveis em dois níveis e um erro igual a 0,001. Os significados dos símbolos na ordenada da figura são: (A) CPEG- concentração do PEG, (B) Citrato- concentração de citrato e (C) pH- valor de pH.....	70
Figura 31 – Diagrama para interpretação geométrica dos efeitos de um planejamento 2^3 , tendo como variável-resposta o coeficiente de partição para analisar a concentração de citrato em função da concentração do PEG.....	71

Figura 32 - Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável-resposta a recuperação, utilizando 3 variáveis em dois níveis. Os significados dos símbolos na ordenada da figura são: (A) CPEG- concentração do PEG, (B) Citrato- concentração de citrato e (C) pH- valor de pH.....	72
Figura 33 – Diagrama para interpretação geométrica dos efeitos de um planejamento 2^3 , tendo como variável-resposta a recuperação da enzima para analisar a concentração de citrato em função da concentração do PEG.....	73
Figura 34 - Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável-resposta aumento de pureza, utilizando 3 variáveis em dois níveis e um erro puro de 0,177. Os significados dos símbolos na ordenada da figura são: (A) CPEG- concentração do PEG, (B) Citrato- concentração de citrato e (C) pH- valor de pH.....	74
Figura 35 – Estabilidade da protease presente no extrato bruto (EB) frente à temperatura em função do tempo, a pH 7,0.....	75
Figura 36 – Estabilidade da protease presente no extrato parcialmente purificado (EPP) frente à temperatura em função do tempo, a pH 7,0.....	76
Figura 37 – Estabilidade da protease presente no extrato bruto (EB) frente ao pH em função do tempo, a temperatura de 5°C.	77
Figura 38 – Estabilidade da protease presente no extrato parcialmente purificado (EPP) frente ao pH em função do tempo, a temperatura de 5°C.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANOVA – Análise de variância
AP – Aumento de pureza
BSA – Albumina de soro bovino
CPEG – Concentração de PEG
EB – Extrato bruto
EPP – Extrato parcialmente purificado
GL – Graus de liberdade
K – Coeficiente de partição
kDa – Quilo Daltons
ln – Logaritmo neperiano
Log K – Logaritmo do coeficiente de partição
MDCK – Células renais caninas Madin-Darby
MMPEG – Massa molar do PEG
MQ – Média quadrática
 M_{rms} – Raiz quadrada da massa molar
MTS – Massa total do sistema
PEG – Polietileno glicol
pI – Ponto isoelétrico
POLICAJU – Polímero da goma do cajueiro
REC – Recuperação
SDFA – Sistema de duas fases aquosas
SDS – Dodecil sulfato de sódio
SQ – Soma quadrática
 V^* - Volume excluído
 $V_{inf.}$ – Volume da fase inferior
 V_r – Razão de volumes
 $V_{sup.}$ – Volume da fase superior
w – Fração mássica

RESUMO

Este trabalho tem como finalidade obter condições de recuperar e purificar a pró-toxina épsilon e uma protease produzida pelo *Clostridium perfringens* através do uso da técnica de extração líquido-líquido em sistema de duas fases aquosas (SDFA) para utilização na produção de vacinas. A aplicação do sistema de duas fases aquosas é proposta como alternativa para a purificação, pois permite a separação e análise de partículas biológicas. Esta técnica é aconselhável para purificação em larga escala pela possibilidade de partição seletiva com altos rendimentos, além de apresentar uma boa relação custo-benefício. Foram construídas as curvas binodais que foram utilizadas para análise da composição dos sistemas de duas fases aquosas formados por polietileno glicol e citrato de sódio, como também a extração e recuperação da pró-toxina épsilon e da protease produzidas por *Clostridium perfringens*. As curvas binodais foram construídas utilizando PEG 400, 550, 1000, 1500, 3350 e 8000 em diferentes valores de pH (6,0; 6,5; 7,0; 7,5 e 8,0) e água para formação do sistema. Também foram construídas curvas na presença de caldo clarificado em substituição à água. Foi avaliada ainda a estabilidade da pró-toxina épsilon, antes da extração, e da protease antes e após a extração, frente às variações de pH e temperatura. Um planejamento experimental (2^{8-3}) foi usado para avaliar a influência das variáveis concentração e massa molar do PEG, concentração de citrato, pH, concentração de NaCl, fator de diluição do extrato, temperatura e massa total do sistema na extração da pró-toxina épsilon. A partição de uma protease presente no meio fermentado de *C. perfringens* foi estudada através do uso de três planejamentos experimentais completos (dois do tipo 2^4 e um do tipo 2^3) que avaliaram a influência das variáveis concentração e massa molar do PEG, concentração de citrato e pH. Três variáveis-resposta foram obtidas (aumento de pureza, coeficiente de partição e recuperação da enzima). Os resultados atingidos foram: coeficiente de partição de 0,57, aumento de pureza de 4,2 com uma recuperação de 131% da atividade enzimática na fase superior do sistema. O sistema de extração que proporcionou as melhores condições de extração foi constituído por: PEG 10000 (g/mol) e concentração de 22% (m/m), concentração de citrato de 8% (m/m) e pH 8,5. A protease permaneceu estável (durante 48 h), mesmo após a extração, nas temperaturas de 5°C e 25°C e nos valores de pH de 6,0 a 9,0.

ABSTRACT

The purpose of this work is to obtain best conditions of recovery and purification of proteins (epsilon prototoxin and a protease) produced by *Clostridium perfringens* through the use of the liquid-liquid extraction by aqueous two-phases systems (ATPS). The application of these systems is proposed as alternative for protein purification, because it allows the separation and analysis of biological particles. This technique is advisable process purification applied to large scale since it provides a selective partition with high yields, and good cost-benefit ratio. The binodal curves were constructed and used to determine the system composition based on polyethylene glycol and citrate concentrations. The binodal curves were built by using PEG 400, 550, 1000, 1500, 3350 and 8000 g/mol at different pH values (6.0; 6.5; 7.0; 7.5 and 8.0). The curves were, initially, built in the presence of water and, later, with clarified fermented broth. The differences in the curve profiles (water versus broth) helped to explain the phase separation behaviour. The stability, as a function of pH and temperature, of the epsilon prototoxin was evaluated before the extraction, while the stability of the protease was evaluated before and after the extraction. An experimental design (2^{8-3}) was used to evaluate the influence of the following variables on epsilon prototoxin extraction: concentration and molar mass of PEG, citrate concentration and NaCl concentrations, pH, dilution factor of the extract, temperature and total mass of the system. However, the partition of the protease was studied through the use of the three full different experimental designs (two of the type 2^4 , and one of the type 2^3) that evaluated the influence of the following variables: concentration and molar mass of PEG, citrate concentration and pH. Three parameter responses were obtained: purification factor; coefficient partition; and recovery yield of the enzyme. The results were satisfactory: partition coefficient = 0.57, purification factor = 4.2; yield = 131%. The extraction conditions which provided the best results were: molar mass of PEG 10000 (g/mol); concentration of PEG of 22% (w/w); concentration of citrate of 8% (w/w); and pH 8.5. The protease was stable (during 48h), even after the extraction, in the temperatures of 5°C and 25°C, and at pH values of from 6.0 to 9.0.

I - INTRODUÇÃO

A toxina épsilon é a mais potente toxina clostridiana após as toxinas botulínica e tetânica. Ela é secretada como um precursor não tóxico (pró-toxina) que é convertido na sua forma ativa após o tratamento com proteases, tais como tripsina, quimotripsina e metaloprotease produzidas por *Clostridium perfringens* tipos B e D. Estes dois tipos de *C. perfringens* são agentes etiológicos de severas e rapidamente fatais enterotoxemias de diversas espécies animais. Em função disso, a pró-toxina épsilon e a protease tripsina, produzidas por *Clostridium perfringens* tipos B e D, foram utilizadas neste estudo de purificação por extração com sistemas de duas fases aquosas (SDFA), utilizando PEG (polietileno glicol) e citrato, visando à aplicação na produção de vacinas.

Sistemas de duas fases aquosas, principalmente os sistemas com polietileno glicol (PEG) e sal, têm sido amplamente usados para biosseparação de enzimas e proteínas por conta do seu baixo custo. Além do mais o tipo do polímero e do sal, força iônica e pH do meio, juntamente com as características da molécula alvo (tamanho carga e hidrofobicidade), são as variáveis que mais influenciam a partição das moléculas. SDFA tem também sido empregado em diversos campos na indústria biotecnológica para purificação de enzimas, interferon, anticorpos, e na bioconversão extrativa. Esta técnica é considerada potencialmente atrativa para obter enzimas industriais, com fácil aumento de escala e minimização da desnaturação das proteínas, entre outras vantagens. Com o objetivo de obter alto rendimento e também bom fator de purificação para a proteína-alvo, uma composição adequada para o SDFA deve ser selecionada para se extrair de forma quantitativa a proteína desejável para uma das fases do sistema com a mínima contaminação possível.

O enfoque principal deste trabalho de Mestrado está na investigação da aplicabilidade do SDFA para purificar a pró-toxina épsilon e a protease de *Clostridium perfringens* usando um planejamento experimental, uma vez que essa ferramenta estatística vem sendo amplamente usada para a otimização e controle de processos biotecnológicos. Esse método é conveniente para estudar efeitos de parâmetros que são influenciados por grande número de variáveis e possibilita a determinação dos efeitos significantes dessas variáveis nas respostas de interesse, que nesse caso são o coeficiente de partição, a recuperação e o fator de purificação da proteína-alvo.

Estudou-se também a estabilidade das moléculas frente às variações de pH e temperatura, verificando que tanto a pró-toxina épsilon como a protease podem ser utilizadas

no processo de extração em sistemas de duas fases aquosas, pois elas mantêm sua atividade biológica tempo suficiente para o desenvolvimento do processo de extração. Finalmente, definiu-se o sistema mais adequado à extração, para o qual a biomolécula de interesse (pró-toxina ou protease) foi obtida junto à fase rica em PEG e as proteínas contaminantes, dirigidas à fase rica em sal.

II -REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

II. 1- *Clostridium perfringens*

Clostridium perfringens é uma das bactérias patogênicas mais amplamente distribuídas na natureza. Pode ser encontrada em amostras de solo, e em conteúdo intestinal de animais e de humanos. Este microrganismo foi primeiro descrito por Welch, Nuttall em 1892 como *Bacillus aerogenes capsulatus*, porém ficou conhecido comumente como *Clostridium welchii*, principalmente no Reino Unido.

É um bacilo anaeróbio, Gram-positivo, não móvel, redutor de nitrato, fermentador de glicose, lactose, maltose, sacarose e outros açúcares, liquefaz gelatina, produz gás e coagula o leite, mas não digere caseína. O crescimento ocorre em temperaturas entre 20°C a 50° C, sendo a temperatura de 45°C considerada ótima. A formação de esporos por *C. perfringens* raramente ocorre em culturas crescidas em meios mínimos e por isso são identificados por outras características. As colônias em ágar-sangue usualmente mostram uma zona de hemólise dupla ao redor da colônia: zona clara devido à toxina teta, e outra zona escura devido à toxina alfa. Em meio contendo gema de ovo, as colônias são circundadas por uma zona opaca devido à ação da toxina alfa, reconhecida como reação de lecitinase (Hatheway, 1990).

O *Clostridium perfringens* é considerado o maior produtor de toxinas bacterianas, sendo conhecidas, um total de 14 (McDonel, 1980; Hatheway, 1990). As quatro mais importantes são: alfa, beta, épsilon e iota as quais são 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: teta, kapa, lambda, mi, ni, gama, eta, urease e neuraminidase; e ainda produz a enterotoxina, que é responsável por doenças alimentares.

O *Clostridium perfringens* é classificado em 5 tipos denominados A, B, C, D e E, mas apenas os tipos B e D produzem a pró-toxina épsilon. *Clostridium perfringens* tipo B e D têm uma limitada série de hospedeiros, sendo principalmente isolados de ovelhas e carneiros, apenas ocasionalmente de cabras e gado, e raramente de humanos (Payne & Oyston, 1997). O microrganismo determina processos infecciosos de alta letalidade, estando envolvido em enfermidades infecciosas agudas e tóxicas, tais como enterotoxemia, doença do rim polposo e gangrena gasosa (Rood et al., 1997).

A enterotoxemia é um termo aplicado a um grupo das infecções entéricas dos ruminantes resultantes da absorção de toxinas produzidas principalmente pelo *Clostridium*

perfringens no trato intestinal. Devido à alta letalidade e às características ecológicas do agente, a erradicação das enfermidades causadas pelos clostrídios é muito difícil. A enterotoxemia tipo D é mais comum em cordeiro, mas é uma importante doença em cabras e vacas e sua distribuição é ubíqua. Esta ocorre raramente em gado adulto, cervos, camelos e cavalos. Embora várias ovelhas hospedem o *Clostridium perfringens* tipo D em seu trato alimentar, o número de bactérias geralmente permanece pequeno devido ao peristaltismo, e a doença clínica não ocorre a menos que o equilíbrio microbiano no intestino seja destruído. Assim, pequena quantidade de pró-toxina épsilon no lúmen intestinal mostra-se ser inofensiva (Finnie, 2004).

As clostridioses são o grupo de doenças que mais matam bovinos no Brasil. Anualmente as perdas chegam a mais de 400 mil animais, com prejuízos diretos em torno de 1,1 bilhão 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 tratam 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).

A imunidade em ovelhas é prontamente produzida por vacinação, diversas vacinas estão sendo ativadas por toxóides alumino-precipitados. Embora a vacinação tenha reduzido substancialmente a prevalência, a doença ainda ocorre comumente. A vacinação tem sido largamente aplicada com toxóides, mas a imunidade para um simples epítipo da pró-toxina épsilon tem se mostrado protetivo. A vacinação com toxóide é também eficiente em vacas, mas é pouco eficiente em cabras (Finnie, 2004).

No Brasil, atualmente está havendo incremento na produção e uso de vacinas contra as clostridioses. Em 1999, foram produzidas 116 milhões de doses de vacinas, 55 milhões delas de vacinas polivalentes com diferentes combinações de espécies do gênero *Clostridium*. O preço das vacinas e da mão-de-obra para imunização varia de 5 a 10% do custo total da produção de um rebanho (Lobato et al., 2000).

II. 1.1- Pró-toxina Épsilon

A pró-toxina épsilon produzida pelo *C. perfringens* tipos B e D é a terceira mais potente toxina clostridiana, após as toxinas botulínica e tetânica. Quando ativada, ela é responsável pela patogênese da enterotoxemia fatal em animais domésticos. Esta toxina exibe toxicidade para células neuronais através do sistema glutaminérgico (Miyamoto et al., 1998; Miyamoto et al., 2000) ou extravasamento no cérebro (Finnie; Blumbergs; Manauis, 1999).

A pró-toxina épsilon é uma proteína com 311 aminoácidos de massa molar 32,7 kDa. A clivagem proteolítica de 13 ou 14 aminoácidos básicos da terminação amino terminal da pró-toxina resulta na ativação da toxina com massa molar de 31,2 kDa. Isto também causa uma mudança no ponto isoelétrico (pI) de 8,02 (pró-toxina) para 5,36 (toxina completamente ativa) e uma significativa mudança na conformação (Payne & Oyston, 1997).

O termo toxina refere-se a proteínas com atividade biológica que são naturalmente antigênicas, sendo suas atividades neutralizadas por anticorpos específicos. As toxinas têm sido usadas para classificar membros da mesma espécie em tipos distintos dependendo das toxinas por ele produzidas (Hatheway, 1990).

O rim polposo é uma doença caracterizada pela formação de edema no cérebro, pulmão, cabeça e rim. A formação deste edema ocorre de forma rápida (12 a 24 horas) e é fatal na maioria das vezes em ovelhas, em cabras e em outros animais domésticos. Estes sintomas decorrem da ligação da pró-toxina épsilon aos receptores nos vasos sanguíneos e na barreira hematoencefálica. A doença do rim polposo está frequentemente associada à mudança brusca de uma alimentação pobre para uma rica em carboidratos, acompanhada por excesso de alimentação (principalmente grãos). A taxa de mortalidade pode ser de 100%, causando um grande impacto econômico, especialmente em animais em confinamento como verificado por Short, Titball e Lindsay (2000).

Sugeriu-se que a toxina épsilon seja formadora de poros baseado nas seguintes observações: (i) a toxina épsilon pode formar um grande complexo na membrana de células renais caninas Madin-Darby (MDCK), permeabilizando-as (Petit et al., 1997; Nagahama; Ochi; Sakurai, 1998); e (ii) o grande complexo formado pela toxina épsilon não se dissocia pelo tratamento com SDS (Petit et al., 1997), que é uma característica comum das toxinas formadoras de poro.

Uma característica da toxina épsilon é seu efeito neurotóxico (Miyata et al., 2001). Outra característica é a ativação do precursor inativo (pró-toxina) por enzimas proteolíticas produzidas pelo mesmo microrganismo tais como: toxinas kapa e lambda ou proteases tais como a tripsina e a quimiotripsina adicionadas ao meio (Hunter et al., 1992). Esta ativação

enzimática aumenta a toxicidade da toxina épsilon em 100 vezes mais que a mínima toxicidade da pró-toxina (Finnie, 2004).

Donelli et al. (2003) investigaram o modo de ação da toxina épsilon de *C. perfringens*, as células MDCK foram tratadas com toxina purificada e incubada a 37°C por até 24 horas. A exposição à toxina épsilon causou uma diminuição tempo-dependente nas interações células-células e células-substrato. Uma modificação paralela no citoesqueleto também foi detectada. Alterações funcionais da membrana plasmática das células MDCK foram avaliadas por citometria de fluxo. Após 10 ou 30 minutos de intoxicação, um aumento do volume celular foi detectado, indicando uma alteração na permeabilidade da membrana plasmática. Estas observações fornecem evidências de que as mudanças no citoesqueleto e que as alterações funcionais da membrana plasmática *in vitro* foram respostas celulares à toxina épsilon de *C. perfringens*.

Finnie (2004) realizou um estudo sobre o atual conhecimento da seqüência de eventos que compreendem as desordens neurológicas associadas com a toxina épsilon de *C. perfringens* tipo D, particularmente em ovelhas, começando com a elaboração desta potente exotoxina no intestino e sua ação deletéria final no cérebro.

O mecanismo de ação da toxina épsilon é ainda desconhecido, sabe-se que a toxina não é internalizada, porém permanece ligada a membrana plasmática de células sensíveis, como observado por imunofluorescência. Ela também interage com a membrana celular da MDCK formando um grande complexo que muda a permeabilidade celular por um mecanismo desconhecido (Petit; Gibert; Popoff, 1999).

Em um modelo em murino, para intoxicação com a toxina épsilon, observou-se um acúmulo primário da toxina no cérebro e rins. Pouco é conhecido o modo de ação celular, mas a toxina ativada tem se mostrado com alta afinidade para ligar-se a sinaptossomos do cérebro de rato e evidências limitadas sugerem que o receptor para a toxina é uma sialoglicoproteína. Todavia, a ação da toxina nas células permanece obscura. Em ratos tratados com toxina purificada mostrou que a permeabilidade da barreira hematoencefálica foi destruída permitindo a ligação de albumina de soro humano dentro do cérebro (Donelli et al., 2003).

Para os estudos experimentais a toxina épsilon tem sido freqüentemente isolada de culturas de *C. perfringens* tipo D. Diversos métodos, incluindo precipitação por sulfato de amônio, cromatografias de exclusão molecular, de ultrafiltração e de troca iônica têm sido usadas para purificar a toxina épsilon (Mozzer, 2002; Payne & Oyston, 1997).

II.1.2 -Tripsina

Tripsina é classificada como uma protease endopeptidase, pois cliva as ligações peptídicas internas das proteínas, transformando-as em peptídeos. Apresenta sua maior atividade catalítica em pH 7,8 aproximadamente e sua massa molar é geralmente entre 20 e 24 kDa (Santos, 2003).

A tripsina presente no meio fermentado de *Clostridium perfringens* é um produto secundário do metabolismo microbiano, pois as proteases produzidas por microrganismos têm a função de clivar as proteínas para serem utilizadas como fonte energética da bactéria. Esta enzima também pode desempenhar outra função importante, que é a ativação das pró-toxinas produzidas pelo *C. perfringens*, ou seja, as pró-toxinas épsilon e iota necessitam de uma ativação realizada por proteases para que as toxinas sejam ativadas.

A tripsina tem diversos usos na indústria farmacêutica, em particular no processo da digestão, sendo intermediária para a obtenção de outras proteínas, como a insulina. A utilização de tripsina tem aumentado muito ultimamente pelo seu uso na obtenção de produtos farmacêuticos, e também como tratamento de edemas, hematomas e dores associadas com diversos tipos de feridas. A tripsina tem sido também empregada em processos na indústria alimentícia e em formulações de alimentos infantis.

Estudos recentes utilizaram a tripsina como proteína modelo para caracterizar a partição desta biomolécula em um sistema de duas fases aquosas formado por polietilenoglicol e o polímero da goma do cajueiro (Oliveira et al., 2002).

II. 2-Purificação de proteínas

O desenvolvimento de técnicas e métodos para separação e purificação de proteínas tem sido um importante pré-requisito para a maioria dos avanços nas indústrias de biotecnologia (Costa et al., 2000). O impulso no desenvolvimento de pesquisas na área de biosseparação tem sido limitado pela dificuldade e complexidade dos processos aplicados a produtos farmacêuticos e biológicos. Cerca de 50 a 90% do custo de produção para um produto biológico reside na estratégia de purificação. Há a necessidade de se obter técnicas de biosseparação em larga escala que sejam eficientes, econômicas e que atinjam altos graus de recuperação e pureza, mantendo a atividade biológica da molécula. 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 (Diamond & Hsu, 1992; Dyr & Suttner, 1997).

A recuperação de produtos de meio fermentado é essencial em muitos processos industriais, e a dificuldade nos processos de recuperação depende significativamente da

natureza do produto. Com isso, sob o ponto de vista econômico, o desenvolvimento e otimização de processos de recuperação e purificação de proteínas passaram a ser de vital importância na produção industrial dessas biomoléculas (Seader & Henley, 1998).

II. 3- Sistema de Duas Fases Aquosas (SDFA)

Os sistemas de duas fases aquosas foram primeiramente descritos na literatura por Beijerick (1896), quando ele descobriu que ao se misturar gelatina, ágar e água, em certas concentrações formava um sistema de duas fases, sendo a fase superior rica em gelatina e a fase inferior rica em ágar. Posteriormente, nos anos 50, Per-Ake Albertsson descobriu que o polietileno glicol (PEG), fosfato de potássio e água, e assim como o PEG, dextrana e água 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; Costa et al., 1998; Costa et al., 2000; Oliveira et al., 2001).

Foi Albertsson que reconheceu a possível utilização destes sistemas como método de separação aplicado a biomoléculas, partículas celulares e células intactas sob condições que preservem a 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).

Os sistemas de duas fases aquosas são geralmente formados por uma solução aquosa de um ou dois polímeros hidrófilos, ou de polímero com determinados sais. Acima da concentração crítica destes componentes ocorre espontaneamente a separação de fases, predominando um ou outro componente em cada uma das duas fases resultantes (Sebastião, 1996; Tubio; Nerli; Picó, 2004).

Uma das características importantes dos sistemas de duas fases aquosas é sua elevada composição em água (cerca de 85-99%), o que permite a partição de biomoléculas e de partículas celulares em condições não desnaturantes. As propriedades físicas dos sistemas bifásicos aquosos podem ser alteradas por manipulação de sua concentração e composição dos polímeros e sais. Deste modo, a partição de moléculas e de partículas biológicas pode ser explorada para obtenção de separações, que de outro modo seriam difíceis ou mesmo impossíveis de serem realizadas (Venâncio, 1996; Gavasane & Gaikar, 2003).

As principais vantagens na purificação de biomoléculas pelo sistema de duas fases aquosas são: a facilidade no aumento da escala; rápida transferência de massa; equilíbrio alcançado com recursos a baixa energia na forma de mistura mecânica; possibilidade de

operação rápida e seletiva; possibilidade de operação à temperatura ambiente e mais econômico que outros processos de separação (Albertsson, 1986).

Os sistemas bifásicos aquosos têm um grande potencial para a eficiente separação e baixo custo das proteínas que podem ser difíceis de separar em uma grande escala. Estes sistemas têm vantagens importantes em sua habilidade de extrair pequenos materiais particulados (extração direta do meio fermentado) e de obter grandes volumes em uma modalidade contínua com tempo de contato curto. Entretanto, os recentes avanços em obter elevados fatores de purificação para a separação da proteína alvo de seus contaminantes usando SDFAs, foram bem sucedidos na escala de laboratório e em operações industriais. Isto é, em parte, devido ao conhecimento da engenharia básica e do entendimento dos sistemas (Merchuk et al., 1998).

As ótimas condições para o rendimento e altos fatores de purificação têm sido obtidas para várias proteínas que foram estudadas. Isto é comumente feito seguindo um procedimento semi-empírico que incluem estudos experimentais dos efeitos das variáveis que influenciam o sistema. Como um exemplo típico é a separação e purificação da proteína taumatina, que foi purificada em 20 vezes e rendimento de 90-95% alcançados em um único passo usando SDFA (Cascone et al., 1991). Isto também foi feito para anticorpos monoclonais (Nielsen & Asenjo, 1991).

A técnica de separação em sistemas de duas fases aquosas é aconselhável para purificação de proteínas em larga escala porque possibilita separação seletiva, uma baixa tensão superficial. Boa biocompatibilidade, bem como a possibilidade de “scale-up” e boa relação custo-benefício. Quando comparada com outras técnicas de recuperação, essa técnica apresenta diversas vantagens, como: operação rápida e contínua, altos rendimentos, reciclagem dos polímeros, minimização da desnaturação de proteínas e facilidade de separar materiais particulados (Cascone et al., 1991; Asenjo, 1990).

O desenvolvimento de extrações líquido-líquido utilizando ao sistema bifásico aquoso em grande escala está muito limitado aos sistemas de PEG-dextrana e PEG-sal. Estes possuem propriedades físicas favoráveis, especialmente no que se refere à viscosidade e a diferença de densidades entre as fases. Esta escolha é bastante influenciada por questões legais a que os processos de produção têm que obedecer, tanto o PEG como a dextrana são substâncias atóxicas e não causam distúrbios ao ambiente (Sarmiento et al., 1994).

II. 3.1-Diagrama de fases do sistema de duas fases aquosas

Para a utilização de SDFA é necessário o conhecimento do comportamento das fases nos sistemas. Para isto são efetuados os diagramas de fases para os componentes, nos quais as

composições dos constituintes para a separação das fases são determinadas. A Figura 1 apresenta um exemplo de diagrama de fases mostrando a composição das fases em equilíbrio.

Na Figura 1 está representada uma curva binodal para um sistema polietileno glicol/citrato de sódio. A curva que divide a região em duas fases é chamada de curva binodal ou curva de equilíbrio. A região acima da curva binodal é chamada de bifásica e a abaixo, monofásica. As linhas são chamadas “tie-lines” ou linhas de amarração e qualquer ponto sobre ela representa um sistema com a mesma composição, porém com diferentes volumes das fases superior e inferior.

Figura 1- Diagrama de fases genérico para um sistema contendo PEG/sal.

A composição dos sistemas é expressa em porcentagem mássica (%m/m), a razão entre a massa do polímero na fase superior e a massa do sal na fase inferior (Esmanhoto, 2002). Quanto mais a composição do sistema se aproxima do ponto crítico (B) menor é a diferença entre as fases, ou seja, no ponto crítico as composições e os volumes entre as fases teoricamente são iguais. No entanto, nas proximidades do ponto crítico, pequenas alterações na composição dos sistemas provocam drásticas mudanças, levando o sistema de uma para duas fases e vice-versa (Albertson, 1986; Kaul, 2002).

As curvas binodais podem ser determinadas por três métodos diferentes. O primeiro deles consiste em determinar a composição das fases que formam o sistema através da cromatografia HPLC. O segundo método citado baseia-se em um processo de titulação entre os componentes que formam os sistemas (PEG, sais e água). A grande vantagem deste

sistema de titulação é a simplicidade e rapidez, porém como o método baseia-se na observação visual de mudança de fase tem-se um determinado grau de imprecisão quando as fases se alternam (Venau & Kula, 1990). O terceiro método que pode ser utilizado consiste na combinação entre os dois métodos citados anteriormente. Este método baseia-se na preparação de vários sistemas de fases com composições diferentes. Em seguida, adiciona-se água em cada sistema sob agitação até as soluções tornarem-se transparentes. Finalmente determina-se a composição dos novos sistemas monofásicos e com isto obtêm-se os pontos da curva binodal (Ribeiro, 2001).

II. 3.2- Polietileno glicol

O polietileno glicol é um composto de grande importância para as áreas biomédicas e de biomateriais (Li, 2001). É produzido mundialmente em grandes quantidades e com massas molares variando de poucas centenas a milhares de Daltons. A designação PEG é usada para compostos de baixa massa molar (abaixo 20.000g/mol) e a designação PEO poli (óxido de etileno) é restrito para compostos de altas massas molares (maiores que 20.000g/mol). Os PEGs com massas molares menores que 1.000g/mol são fornecidos na forma de soluções incolores estáveis ou pastas. Os de massas molares elevadas, acima de 1.000g/mol, são encontrados na forma de pó ou flocos brancos. Podem ser estocados à temperatura ambiente, embora a 4°C a ocorrência de oxidação em soluções seja retardada (Ribeiro, 2001).

A utilização do PEG é de grande interesse na biotecnologia principalmente por excluir, em ambiente aquoso, outros polímeros de sua vizinhança, não se solubilizando com eles. Por serem compostos biodegradáveis e atóxicos, a descarga de PEG não é problemática para o meio ambiente. O PEG possui uma variedade de propriedades pertinentes para aplicações biomédicas, são elas: insolubilidade em água a elevadas temperaturas, forma complexos com cátions metálicos, alta mobilidade com grande poder de volume excluído em água, agente precipitante de proteínas e ácidos nucléicos. Vale ressaltar que o PEG foi aprovado para consumo interno pelo FDA (Food and Drug Administration) (Li, 2001).

II. 3.3- Variáveis que influenciam o sistema de duas fases aquosas

São diversos as variáveis que influenciam na formação e na partição de biomoléculas dos sistemas bifásicos aquosos. Entretanto, o um fator importante para todos os sistemas de duas fases aquosas é o equilíbrio e a separação das fases. Para cada sistema seja polímero/polímero ou polímero/sal existe um diagrama de fases que define as proporções entre os componentes formadores das fases. Alguns desses diagramas estão disponíveis na literatura (Albertsson, 1986), porém é importante que ao se iniciar o trabalho com um novo

sistema se construa um diagrama adequado às condições de trabalho a serem utilizadas na extração (temperatura, pH, massa molar do PEG e adição de suspensões biológicas).

As variáveis que influenciam a partição de biomoléculas entre duas fases podem ser classificados como variáveis inerentes ao próprio sistema (p.ex: componentes do sistema, massa molar do polímero, concentração do polímero ou do sal, pH e temperatura) ou à proteína alvo (p.ex: hidrofobicidade, distribuição de cargas, ponto isoeletrico e massa molar) (Costa et al., 1998; Costa et al., 2000; Oliveira et al., 2001; Oliveira et al., 2003; Tubio; Nerli; Picó, 2004).

Os mecanismos que governam a partição de materiais biológicos não são ainda entendidos por completo, sabe-se que o coeficiente de partição é resultante de forças de Van der Waals, hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e interações iônicas das biomoléculas com as fases do sistema (Gündüz & Korkmaz, 2000).

II. 3.4- Massa molar e concentração do polímero

Em geral, um aumento da massa molar do polímero do sistema de duas fases aquosas, para 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).

O efeito da massa molar dos polímeros por sua vez depende da massa molar da biomolécula a ser separada. No caso de proteínas, aquelas com massas molares maiores são mais influenciadas pelas mudanças na massa molar dos polímeros que as proteínas com pequena massa molar (Asenjo, 1990). O PEG é capaz de excluir (teoria do volume excluído) as proteínas sem desnaturação de acordo com o aumento de sua massa molar. O mesmo efeito não pode ser observado quando as moléculas menores de proteínas são utilizadas (Schmidt et al., 1994).

A massa molar do polímero influencia na separação do biomaterial por alteração do diagrama de fase (isto é, por influenciar a composição das fases) e por mudança no número de interações polímero-proteína. Em geral, o aumento na massa molar de um dos polímeros (em sistemas polímero/polímero) levará a uma separação mais acentuada do material em outra fase. Entretanto, a magnitude desse efeito decresce com o aumento da cadeia do polímero (Albertson, 1986; Forciniti & Hall, 1991).

Com relação à concentração do polímero, tem sido demonstrado que o sistema de fases desloca-se em direção à região bifásica com o aumento da concentração do polímero. A

viscosidade das fases também aumenta com o aumento na concentração do polímero e isto pode influenciar a partição da proteína alvo (Asenjo, 1990; Albertsson, 1986). Além disso a concentração do polímero a ser usada para a separação de fases depende da massa molar do mesmo. Geralmente, tem sido observado para sistemas PEG/dextrana que o aumento na massa molar do polímero leva ao uso de baixas concentrações do mesmo para a separação das fases (Diamond & Hsu, 1992).

Estudos feitos por Schmidt et al. (1994) mostraram que o aumento da concentração de PEG em um sistema PEG/fosfato causa um decréscimo de 3,2 vezes no coeficiente de partição da α -amilase. Enquanto que em um sistema PEG 4000/fosfato um aumento da concentração de PEG de 14% para 20% proporcionou um aumento de 5 vezes no valor do coeficiente de partição da enzima.

II. 3.5- Tipo de cátion e pH

A influência da carga da biomolécula na sua partição pode ser estudada medindo o coeficiente de partição a vários valores de pH. Contudo, esta influência da carga da biomolécula depende muito do tipo de sal presente no sistema, uma vez que diferentes sais dão origem a diferentes potenciais elétricos entre as fases. Mudanças no pH podem também induzir mudanças conformacionais na estrutura das proteínas, causando mudança em seus comportamentos de separação. Em condições extremas de pH é possível que ocorra a desnaturação das proteínas. Geralmente, a partição de proteínas desnaturadas é diferente da partição das mesmas proteínas na forma nativa, o que pode ser atribuído não só a maior área superficial da forma desnaturada, mas também ao fato da superfície exposta desta ser muito mais hidrofóbica (Albertsson, 1986). Como regra geral às proteínas carregadas mais negativamente (nos casos em que o pH é superior ao pI) tem maior afinidade pela fase superior que é rica em PEG.

O aumento no coeficiente de partição com o aumento do pH tem sido observado para várias proteínas, como por exemplo, taumatina (Cascone et al., 1991), imunoglobulina-G, L-aspartase, fumarase, hemoglobina e ribonuclease (Huddleston et al., 1991). A manipulação do pH de SDFA tem sido explorada para obter separação diferencial de proteínas em uma variedade de esquemas de purificação. A influência de pH na separação de várias proteínas puras e de homogeneizados de leveduras tem sido estudada (Huddleston et al., 1991).

A partição de albumina de soro bovino – BSA em sistemas de polietileno glicol 3350/dextrana/fosfato foi investigada em diferentes valores de pH (4,2; 5,0; 7,0; 9,0 e 9,8). O coeficiente de partição do BSA diminuiu de 0,062 para 0,021, quando os valores de pH do sistema de duas fases aquosos aumentaram (Gündüz & Korkmaz, 2000).

II. 3.6- Adição de sais

A composição do sal é outra variável de suma importância na partição de todas as espécies de moléculas e partículas celulares. Embora os sais se separem igualmente entre as fases, existem diferenças significativas no coeficiente de partição das proteínas em função do tipo de sal (Costa et al., 1998).

Os sais de fosfato têm maior afinidade pela fase inferior do sistema de duas fases, o lítio tem maior afinidade pela fase superior e o NaCl tem afinidade para ambas as fases. Portanto, os sais que possuem distribuição diferenciada entre as duas fases são importantes para o sistema, pois eles terão grande influência na diferença de potencial elétrico entre as fases. Por exemplo, a partição dos íons fosfato para a fase inferior cria um potencial elétrico com uma carga negativa nesta fase que força a partição das macromoléculas ou células carregadas negativamente para a fase superior. Com o aumento da concentração de NaCl, o efeito da distribuição desigual dos íons fosfato pode ser reduzido ou eliminado. Com isto, a mudança na composição iônica pode influenciar, e muito, o coeficiente de partição de uma molécula (Forciniti, 2002).

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 diferenças nos coeficientes de partição de 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).

A adição de sais neutros, tais como NaCl, em um sistema PEG/dextrana tende a diminuir o coeficiente de partição das proteínas carregadas negativamente e tende a aumentar o coeficiente de partição das proteínas carregadas positivamente. A magnitude do efeito aumenta na seguinte ordem: $\text{SO}_4^{-2} < \text{F}^- < \text{Cl}^- < \text{I}^- < \text{e}^-$ e $\text{NH}_4^+ < \text{Na}^+ < \text{K}^+$ (Cascone et al., 1991; Schmidt et al., 1996).

O fato de a partição depender de um grande número de variáveis distintas confere considerável versatilidade aos sistemas de duas fases aquosas na separação de misturas de componentes. Entretanto, a existência de tantas variáveis, a sua grande maioria interdependentes, torna extremamente difícil a previsão teórica do coeficiente de partição de um dado soluto, obrigando por vezes a um trabalho experimental exaustivo (Kula et al., 1982).

II. 3.7- Temperatura

A influência da temperatura é bastante complexa devido ao seu efeito na composição das fases em equilíbrio, assim como a alteração da estrutura da biomolécula e desnaturação (Sarubbo, 2000). Geralmente, para baixas temperaturas (menores que 20°C) a curva binodal desloca-se em direção às baixas concentrações dos componentes que formam as fases, resultando no aumento do comprimento das linhas de amarração. Os sistemas de fases próximos do ponto crítico podem ser mais influenciados pela mudança de temperatura devido à sua instabilidade, quando a curva binodal é deslocada, podendo assim os sistemas passarem facilmente para a região monofásica (Bamberger et al., 1985; Tjerneld et al., 1990).

O efeito da temperatura varia de acordo com o tipo de sistema, polímero/polímero ou polímero/sal. Para o sistema PEG/dextrana, foi constatada que com o aumento da temperatura era necessário uma concentração maior dos polímeros para a separação das fases. Neste caso, para que a separação das fases seja favorecida, deve-se trabalhar em temperaturas inferiores à ambiente. Já para PEG/sal, ocorre justamente o contrário, pois em temperaturas maiores ou próximas à ambiente a separação das fases do sistema é facilitada. Foi observado também para o sistema PEG/sal, que o aumento da temperatura favorece o aumento da concentração de PEG na fase superior do sistema e conseqüentemente ocorre uma redução da concentração do polímero na fase inferior (Forciniti & Hall, 1991; Zaslavsky, 1995).

Alguns trabalhos relatam um aumento do coeficiente de partição com a temperatura (Johansson et al., 1984); outros, que não há relação entre o coeficiente de partição e a temperatura (Tjerneld et al., 1985), demonstrando a necessidade de estudos mais aprofundados para se esclarecer o efeito deste parâmetro sobre a partição.

O efeito da temperatura na posição da curva binodal foi estudado em sistemas polímero-polímero por Oliveira et al. (2001). As curvas binodais permaneceram inalteradas com a temperatura. Diamond & Hsu (1992) descreveram que o sistema celulose/dextrana também não foi afetado pela temperatura.

II. 3.8- Tempo de separação das fases

O tempo de separação das fases após a mistura dos componentes depende do tipo de sistema. Sistemas contendo PEG/sal possuem tempo de separação de fases menor que os sistemas contendo PEG/dextrana devido à densidade e viscosidade do sistema. Em sistemas dextrana/ficoll, o tempo varia de 1 a 6 horas pela ação da gravidade, enquanto em sistemas PEG/dextrana esse valor cai para 5 a 30 minutos dependendo da concentração e do peso molar dos polímeros (Albertsson, 1986).

Outro fator que também influencia o tempo de separação é a velocidade de coalescência das pequenas bolhas que se formam durante a agitação. Quando se agita um sistema de fases de maneira a uniformizá-lo, inicialmente ocorre formação de pequenas regiões ricas em cada componente. Com o tempo, essas regiões aumentam e ocorre separação em duas regiões distintas (Bamberger et al., 1985).

A posição em relação ao ponto crítico também exerce influência no tempo de separação das fases. Nos sistemas próximos ao ponto crítico, o tempo de separação é maior devido a uma pequena diferença de densidade. Já no caso dos sistemas muito distantes do ponto crítico, a viscosidade aumenta devido ao aumento da concentração do polímero, tornando a separação de fases mais lenta (Bamberger et al., 1985; Albertsson, 1986).

Oliveira et al. (2001) verificaram o tempo de separação das fases pela gravidade normal. O tempo de separação para o sistema PEG-policaजू foi muito curto (entre 45 e 360 segundos), enquanto que sistemas PEG-sal e PEG-dextrana apresentam tempo de separação entre 5 e 30 minutos.

II. 3.8- Adição de suspensões biológicas

Na recuperação de macromoléculas de caldos fermentados ou de extratos biológicos, uma medida prática usando um sistema de duas fases aquosas (SDFA) envolvendo misturas de polietileno glicol (PEG) e sais tem sido usadas eficazmente para manuseio de partículas e solutos. No entanto, a aplicação do processo de extração em SDFA para recuperação de produtos de suspensões biológicas requer conhecimentos sobre as desvantagens associadas com a caracterização de SDFA que serão trabalhados.

No desenvolvimento de um processo de recuperação de proteínas, o efeito de suspensão biológica, nas características da separação de um sistema, deve ser considerado. Fracionamento de suspensões biológicas em SDFA para recuperação de proteínas alvo no processo de extração. A presença de biomassa em SDFA tem uma forte influência na modificação da posição da curva binodal do diagrama de fases. Deslocamentos da origem da curva binodal são atribuídos à presença de fragmentos celulares (debris) e polímeros intracelulares, o qual reduzem a quantidade de reagentes necessária para formar o sistema de duas fases.

Rito-Palomares & Cueto (2000) estudaram a influência de suspensões biológicas na posição da curva binodal em sistemas de duas fases aquosas (SDFA). Três diferentes suspensões biológicas (leveduras rompidas, homogeneizado de *E. coli* e caldo fermentado de *Trichoderma harzianum*) foram selecionadas e seu impacto sobre o desempenho de SDFA foi avaliado com base na mudança de razão de volumes ($V_r = V_{sup}/V_{inf.}$) e a posição da curva

binodal em SDFA acrescidos de biomassa. O efeito da adição de suspensões biológicas em SDFA foi realizado pela escolha de 15 sistemas que foram escolhidos pelos diferentes valores de V_r e linhas de amarração, que definiram sua posição no diagrama de fases em relação às curvas binodais. Os ensaios realizados envolveram a montagem de sistemas com água deionizada em substituição à suspensão biológica e em sistemas com a adição de suspensão biológica.

Nos experimentos realizados, o acúmulo de biomassa em cada fase causou um aumento de volume nas fases do sistema. Então, a razão de volumes foi aumentada pelo acúmulo de biomassa na fase superior ou diminuída com o acúmulo de biomassa na fase inferior. Sistemas próximos e distantes da curva binodal foram selecionados para se examinar o comportamento da razão de volumes em sistemas biológicos.

Um grande deslocamento da curva binodal de sua origem foi observado no ponto crítico do diagrama de fases constituído na presença de caldo fermentado de *T. harzianum*. Tal comportamento da curva pode ser explicado pela natureza do inóculo utilizado. O caldo fermentado é caracterizado por alta viscosidade causada pela presença de biopolímeros produzidos durante a fermentação, que faz uma contribuição importante para o sistema e reduz a quantidade de reagentes necessários para a formação das duas fases.

II. 4- Sistemas de duas fases aquosas compostos de PEG/sais

Os sistemas de duas fases aquosas formados por PEG/sais de fosfato têm sido amplamente utilizados para extração de proteínas diversas (Gündüz & Korkmaz, 2000; Srinivas et al., 2002; Mayerhoff et al., 2004), mas outros sais estão sendo utilizados para a composição dos sistemas, tais como, sulfato de amônio (Zavarzina et al., 2002) e citrato de sódio (Marcos et al., 2002).

O trabalho realizado por Vernau & Kula (1990) utilizando PEG e citrato para extração de R-Oxinitrilase apresentou resultados interessantes. A utilização do citrato no trabalho foi justificada por apresentar vantagens em relação ao uso de outros equivalentes como o fosfato e o sulfato com alta seletividade e por razões econômicas e ambientais. Observou-se utilizando um sistema formado por PEG 1550 e citrato de sódio, obteve-se rendimento de 99% e fator de purificação de 14,6 para a enzima R-Oxinitrilase.

Através dos resultados obtidos por Vernau & Kula (1990), Oliveira et al. (2001) e por Oliveira et al. (2003) pode-se concluir que o sistema de duas fases aquosas envolvendo um polímero, o PEG, e um sal, como o citrato de sódio, pode ser aplicado para a extração ou pré-purificação de proteínas. O citrato é um sal biodegradável e pode ser reciclado ou pode ser descarregado em plantas de tratamento de água de resíduos biológicos. Uma desvantagem

que deve ser considerada é a atividade quelante do citrato de sódio que pode interferir em reações que envolvam íons metálicos durante o processo extrativo.

O sistema de duas fases aquosas utilizando PEG/citrato vem sendo utilizado recentemente como uma alternativa para a purificação de biomoléculas, que possuem aplicação na indústria de medicamentos. Marcos et al. (1998, 1999 e 2002) utilizou o sistema PEG/citrato para purificar a enzima Penicilina acilase, produzida por *Escherichia coli*, que na indústria farmacêutica participa na produção de antibióticos β -lactâmicos semi-sintéticos, tais como ampicilina e amoxilina.

Esmanhoto (2002) propôs a purificação parcial do antibiótico rentamicina, a partir de culturas de *Streptomyces olindensis*. Este antibiótico tem atividade antitumoral e o sistema PEG/citrato foi aplicado uma vez que os métodos tradicionais de extração de antibióticos antraciclínicos utilizam solventes orgânicos.

II. 5- Polímeros alternativos para extração em SDFA

Vários sistemas são utilizados atualmente como PEG/sais e outros baseados em dextrana, amido e derivados celulósicos devido à vantagem de serem biodegradáveis. Oliveira et al. (2001) estudaram um novo sistema de duas fases aquosas formado por PEG e goma de cajueiro (Policaju) a qual mostrou potencial utilização como polímero para formação de sistemas aquosos. A disponibilidade de um polímero barato para a partição de fases é economicamente viável para o uso conjunto com PEG na separação de biomoléculas.

Diagramas de fases foram desenvolvidos os sistemas PEG/POLICAJU. A influência da massa molecular do PEG, comprimento da linha de amarração e pH na partição da albumina de soro bovino (BSA) foi investigada. Foi observado que o aumento da massa molar do polímero de 4000 para 8000 exigiu menor quantidade do polímero para separação das fases. O coeficiente de partição do BSA foi influenciado levemente pela mudança da massa molar do polímero. O aumento da concentração do polímero promoveu uma diminuição no coeficiente de partição da proteína, porém o aumento do pH também elevou o coeficiente de partição da proteína (Sarubbo, 2000).

II. 6- Aplicação de planejamentos experimentais em SDFA

A separação das proteínas em duas fases 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, que são as principais variáveis que interferem com o coeficiente de partição. As variáveis e mecanismos que causam a

distribuição desigual de proteínas entre as fases são pouco conhecidas, mas regras empíricas têm sido desenvolvidas.

A utilização de planejamentos experimentais é uma ótima ferramenta para se conhecer os principais fatores relacionados com cada tipo de extração e tipo de proteína que se quer separar.

Costa et al. (2000) avaliaram as influências de 5 parâmetros (pH, 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 massa molar do PEG, concentração de PEG e concentração de NaCl exerceram um significativo efeito sobre o valor do coeficiente de partição.

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 onde as variáveis trabalhadas foram as concentrações de PEG3350, citrato de sódio e NaCl.

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

A elaboração de planejamentos experimentais tem sido de fundamental importância nestes estudos, pois reduziu o número de experimentos necessários, indicando as principais variáveis que interferem significativamente no SDFA e ainda indicam os efeitos de interação entre as variáveis.

III-OBJETIVOS

III. 1-Objetivo geral

Purificar a pró-toxina épsilon e uma protease (tripsina) a partir do meio de cultivo de *C. perfringens*, pelo processo de extração líquido-líquido em sistemas de duas fases aquosas utilizando PEG/citrato.

III. 2-Objetivos específicos

- Avaliar a estabilidade da pró-toxina épsilon frente às variações de pH e temperatura em função do tempo.
- Estudar a influência das variáveis (massa molar e concentração do PEG, pH, temperatura, massa total do sistema, fator de diluição, concentração de citrato e de NaCl) sobre a extração da pró-toxina épsilon utilizando sistema de duas fases aquosas, através de um planejamento experimental fracionário do tipo 2^{8-3} , tendo como respostas o coeficiente de partição, a recuperação e o aumento de pureza.
- Estudar a influência das variáveis (massa molar e concentração do PEG, pH e concentração de citrato) sobre a extração de uma protease (tripsina) presente no meio fermentado de *C. perfringens* utilizando sistema de duas fases aquosas, e otimizar a extração com auxílio de planejamentos estatísticos (2^4 e 2^3), tendo como respostas o coeficiente de partição, a recuperação e o aumento de pureza.
- Avaliar a estabilidade da protease antes e após a extração em sistemas de duas fases aquosas, frente às variações de pH e temperatura em função do tempo.

IV-MATERIAIS

IV.1 - Obtenção da pró-toxina épsilon

O sobrenadante da cultura de *Clostridium perfringens* tipo D contendo a pró-toxina épsilon, a pró-toxina épsilon purificada e os materiais necessários para a realização do ELISA (*Enzyme linked immunosorbent assay*), tais como a imunoglobulina G policlonal de carneiro (anti-toxina épsilon) e o conjugado que possui a enzima peroxidase foram gentilmente cedidos pela Indústria Farmacêutica VALLÉE S.A., localizada em Montes Claros no estado de Minas Gerais. Todos os materiais foram mantidos a -80°C até o uso.

IV.2 -Reagentes utilizados

O polietileno glicol com diferentes massas molares, a tripsina, a albumina, o orto-fenilenodiamina (OPD), o Trishidroxiaminometano (Tris) e o comassie blue G-250 foram obtidos da Sigma Chemical CO. O ácido cítrico e o citrato de sódio foram obtidos da Merck-Schuchard e os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

V. MÉTODOS

V.1 - Estabilidade das biomoléculas frente às variações de pH e temperatura em função do tempo.

Para verificar a estabilidade da pró-toxina épsilon e da protease foi realizada a sua atividade em meio tamponado com variação de pH (4,0-9,0) e de temperatura (5,0°C, 15,5°C e 26,0°C para a pró-toxina e 5,0°C, 25,0°C e 40,0°C para a protease).

Foi realizada uma pré-incubação do meio fermentado contendo a pró-toxina épsilon ou a protease antes da extração nos valores de pH 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0 e nas temperaturas anteriormente descritas. O tempo de incubação foi de 120 horas para a pró-toxina e de 48 horas para a protease presente no meio fermentado (extrato bruto – EB) e na fase superior do sistema (extrato parcialmente purificado – EBB) sendo as amostras coletadas para as medidas residuais da atividade biológica (Figura 2). Este estudo foi fundamental para definição das variáveis pH e temperatura nos estudos de extração empregando planejamento experimental.

Figura 2 – Fluxograma dos experimentos de estabilidade frente às variações de pH e temperatura em função do tempo.

V. 2-Construção das Curvas Binodais

As curvas binodais foram construídas pelo método de titulação (Albertsson, 1986). Em um tubo de ensaio graduado, foi adicionada aproximadamente 1g (anotando-se a massa verdadeira) da solução de citrato de sódio/ácido cítrico no pH desejado (solução estoque previamente preparada a 30% m/m) e sobre essa solução, vagarosamente e sob constante agitação, a solução de PEG (solução estoque previamente preparada a 50% m/m) foi adicionada, até que a mistura ficasse turva, ou seja, bifásico (controle visual). A massa (g) de PEG adicionada sobre o citrato foi anotada para os cálculos das concentrações dos componentes do sistema. A seguir, a água foi adicionada ao tubo em quantidade suficiente para que o sistema voltasse a ser monofásico (transparente), anotando-se a massa. Adicionou-se novamente a solução estoque de PEG até que o sistema voltasse a ser bifásico (turvo), depois água e assim sucessivamente (Figura 3). O valor das massas do PEG, do citrato e da água consumido durante as etapas foi utilizado para a construção das curvas binodais.

Foram realizados diagramas de fases com água e com meio fermentado, para verificar a influência dos componentes presentes no meio fermentado no deslocamento das curvas binodais. Todos os diagramas de fases foram realizados na temperatura de $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Figura 3 – Esquema da metodologia da construção das curvas binodais.

V. 3-Extração líquido-líquido em Sistemas de Duas Fases Aquosas

A variáveis estudadas foram: massa molar e concentração do PEG, concentração de citrato, pH, na extração da pró-toxina épsilon ou da tripsina contidas no extrato bruto obtidos de *Clostridium perfringens* tipo D.

Para a extração da pró-toxina ou da protease, os sistemas foram preparados inicialmente com PEG e sal citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) acrescido de ácido cítrico para o ajuste do pH segundo metodologia descrita por Oliveira et al. (2001). A variação da proporção entre o citrato de sódio e o ácido cítrico foi o que definiu o valor do pH de extração.

Em tubos de centrífuga graduados (15mL), previamente calibrados, 2,0 g da amostra contendo a biomolécula (pró-toxina ou protease) foram misturados ao sistema. Em seguida, a água deionizada foi adicionada para ajustar a concentração final desejada dos componentes e, ainda, manter constante a massa final do sistema (Figura 4).

A mistura foi agitada em vórtice por 1 minuto e colocada em repouso por 40 minutos para a separação das fases. Após a leitura dos volumes das fases e do valor de pH das mesmas, amostras foram retiradas para as análises de atividade biológica e de conteúdo protéico. Estas análises possibilitaram o cálculo do aumento de pureza, do coeficiente de partição e da recuperação da biomolécula.

Figura 4 – Esquema da rotina de ensaios da extração de duas fases aquosas.

V. 4-Planejamento fracionário para extração da pró-toxina épsilon em SDFA

Para os experimentos preliminares de extração foi determinada a utilização de um planejamento estatístico fracionário do tipo 2^{8-3} , segundo Barros Neto et al. (2002), onde foram estudadas as variáveis e os seus limites foram determinados da seguinte forma:

- 1-concentração de PEG: 20% a 24% - através dos diagramas de fases, construídos com o meio fermentado;
- 2-concentração de citrato: 15% a 20% - através dos diagramas de fases, construídos com o meio fermentado;
- 3-pH: 6,0 a 8,0 – função da estabilidade;
- 4-massa molar do PEG: 400 a 8000 g/mol – dados de literatura;
- 5-fator de diluição do meio fermentado: sem diluir até diluído 4 vezes;
- 6-concentração de NaCl: 0 a 10 % de NaCl – dados de literatura;
- 7-temperatura: 5° C a 26° C - função da estabilidade;
- 8-massa total do sistema: 3g a 10g - questões operacionais.

Para análise estatística dos resultados foram utilizadas 3 variáveis-respostas: coeficiente de partição, aumento de pureza e recuperação. A melhor condição final de extração foi definida como aquela que proporcionou a melhor combinação entre as três respostas.

As extrações no ponto central foram realizadas para possibilitar o cálculo do erro experimental. Após a realização dos experimentos foi feita a análise estatística dos resultados, com o auxílio do software *Statistica* 6.0.

Tabela 1- Níveis dos 8 variáveis utilizados na extração SDFA PEG/citrato da pró-toxina épsilon. O número -1 representa o nível mínimo, o zero é o ponto central e o +1 representa o nível máximo.

Número	Variáveis	Inferior (-1)	Central (0)	Superior (+1)
01	Concentração do PEG	20%	22%	24%
02	Concentração de citrato	15%	17,5%	20%
03	pH	6,0	7,0	8,0
04	Massa molar do PEG	400	3350	8000
05	Fator de diluição	4	2	SD
06	Concentração de NaCl	0%	5%	10%
07	Temperatura	5° C	15,5°C	26°C
08	Massa total do sistema (MTS)	3g	6,5g	10g

Tabela 2- Matriz do planejamento fracionário 2⁸⁻³ das extrações por SDFA de PEG/Citrato.

Ordem*	Seqüência	MM PEG (g/mol)	PEG (%m/m)	Citrato (% m/m)	pH	NaCl (%m/m)	Fator de diluição	T (°C)	MTS** (g)
31	1	400	20	15	6	0	4	5	10
04	2	8000	20	15	6	0	SD	26	10
12	3	400	24	15	6	0	SD	26	3
02	4	8000	24	15	6	0	4	5	3
11	5	400	20	20	6	0	SD	5	3
10	6	8000	20	20	6	0	4	26	3
17	7	400	24	20	6	0	4	26	10
21	8	8000	24	20	6	0	SD	5	10
32	9	400	20	15	8	0	4	26	3
18	10	8000	20	15	8	0	SD	5	3
28	11	400	24	15	8	0	SD	5	10
35	12	8000	24	15	8	0	4	26	10
15	13	400	20	20	8	0	SD	26	10
06	14	8000	20	20	8	0	4	5	10
16	15	400	24	20	8	0	4	5	3
08	16	8000	24	20	8	0	SD	26	3
33	17	400	20	15	6	10	4	5	3
27	18	8000	20	15	6	10	SD	26	3
24	19	400	24	15	6	10	SD	26	10
13	20	8000	24	15	6	10	4	5	10
05	21	400	20	20	6	10	SD	5	10
34	22	8000	20	20	6	10	4	26	10
19	23	400	24	20	6	10	4	26	3
23	24	8000	24	20	6	10	SD	5	3
03	25	400	20	15	8	10	4	26	10
20	26	8000	20	15	8	10	SD	5	10
26	27	400	24	15	8	10	SD	5	3
25	28	8000	24	15	8	10	4	26	3
22	29	400	20	20	8	10	SD	26	3
14	30	8000	20	20	8	10	4	5	3
29	31	400	24	20	8	10	4	5	10
07	32	8000	24	20	8	10	SD	26	10
01	33	3350	22	17,5	7	5	2	15,5	6,5
30	34	3350	22	17,5	7	5	2	15,5	6,5
09	35	3350	22	17,5	7	5	2	15,5	6,5

* essa coluna indica a ordem na qual as extrações foram conduzidas – aleatória (sorteio)

** MTS – Massa Total do Sistema

V. 5-Planejamento experimental para extração da protease (tripsina) em SDFA

Para os experimentos de extração da protease foram utilizados três planejamentos estatísticos completos, dois do tipo 2^4 e um do tipo 2^3 , sempre com 4 repetições no ponto central segundo Barros Neto et al. (2002), onde foram estudadas as seguintes variáveis: massa molar do PEG, concentração de PEG, concentração de citrato e pH. Os limites das variáveis foram modificados em cada planejamento com a finalidade de melhorar a purificação da protease.

Para análise estatística dos resultados foram utilizadas 3 variáveis respostas: coeficiente de partição, aumento de pureza e recuperação na fase superior do sistema. A melhor condição final de extração foi definida como aquela que proporcionou a melhor combinação entre as três respostas.

As extrações no ponto central foram realizadas para possibilitar o cálculo do erro experimental. Após a realização dos experimentos foi feita a análise estatística dos resultados, com o auxílio do software *Statistica* 6.0.

Tabela 3- Níveis dos variáveis utilizados no primeiro planejamento 2^4 para extração da protease em SDFA.

Variáveis	Níveis		
	Inferior (-1)	Central (0)	Superior (+1)
Massa molar do PEG (g/mol)	400	3350	8000
Concentração do PEG %(m/m)	20	22	24
pH	6,0	7,0	8,0
Concentração de citrato %(m/m)	15	17,5	20

Tabela 4- Níveis dos variáveis utilizados no segundo planejamento 2^4 para extração da protease em SDFA.

Variáveis	Níveis		
	Inferior (-1)	Central (0)	Superior (+1)
Massa molar do PEG (g/mol)	1500	3350	10000
Concentração do PEG %(m/m)	22	24	26
pH	7,0	7,5	8,0
Concentração de citrato %(m/m)	12	15	18

Tabela 5- Níveis dos variáveis utilizados no planejamento 2^3 para extração da protease em SDFA. A massa molar do PEG foi fixada em 10000.

Variáveis	Níveis		
	Inferior (-1)	Central (0)	Superior (+1)
Concentração do PEG %(m/m)	22	24	26
pH	7,5	8,0	8,5
Concentração de citrato %(m/m)	8	10	12

Tabela 6- Matriz dos planejamentos (2⁴) com 20 extrações da protease por SDFA.

Seqüência *	Massa molar do PEG (g/mol)	Concentração do PEG %(m/m)	pH	Concentração de citrato %(m/m)
01	-1	-1	-1	-1
02	+1	-1	-1	-1
03	-1	+1	-1	-1
04	+1	+1	-1	-1
05	-1	-1	+1	-1
06	+1	-1	+1	-1
07	-1	+1	+1	-1
08	+1	+1	+1	-1
09	-1	-1	-1	+1
10	+1	-1	-1	+1
11	-1	+1	-1	+1
12	+1	+1	-1	+1
13	-1	-1	+1	+1
14	+1	-1	+1	+1
15	-1	+1	+1	+1
16	+1	+1	+1	+1
17	0	0	0	0
18	0	0	0	0
19	0	0	0	0
20	0	0	0	0

* A ordem de extrações foi feita por sorteio aleatório.

Tabela 7- Matriz do planejamento (2³) com 12 extrações da protease por SDFA.

Seqüência *	Concentração do PEG %(m/m)	Concentração de citrato %(m/m)	pH
01	-1	-1	-1
02	+1	-1	-1
03	-1	+1	-1
04	+1	+1	-1
05	-1	-1	+1
06	+1	-1	+1
07	-1	+1	+1
08	+1	+1	+1
09	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0
12	0	0	0

* A ordem de extrações foi feita por sorteio aleatório

V. 6-Determinação do conteúdo protéico

A concentração de proteínas totais foi determinada de acordo com a metodologia de Bradford (1976) empregando como branco uma amostra retirada de uma extração utilizando água em substituição da solução contendo a biomolécula (pró-toxina ou protease), mas

preparada da mesma forma. Sendo através dele que é feito o cálculo de recuperação de proteínas totais em cada fase do SDFA.

O reativo de Bradford foi preparado pela mistura de 100 mg de Coomassie Blue G-250 em 50 mL de etanol a 95% sob agitação, sendo depois adicionado 100 mL de ácido ortofosfórico a 85%. Esta solução foi armazenada em vidro âmbar a temperatura ambiente ($26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$). A solução de uso foi preparada com 10 mL de solução estoque e o seu volume completado para 100 mL com água deionizada, depois foi filtrada duas vezes em filtro qualitativo. A solução de uso foi utilizada por até duas semanas.

O ensaio foi realizado com 50 μL da amostra em 2,5 mL de reativo, a solução foi homogeneizada e lida em espectrofotômetro a 595 nm após 2 minutos de descanso. Os ensaios foram realizados em triplicata.

A curva de calibração foi obtida nas concentrações de 0 a 1000 $\mu\text{g/mL}$, usando uma solução de albumina de soro bovino - BSA.

V. 7-Determinação da atividade biológica da pró-toxina épsilon

A técnica de ELISA (“*Enzyme linked immunosorbent assay*”) foi utilizada para determinar a atividade da pró-toxina épsilon produzida pelo *Clostridium perfringens* nas fases superior (fase rica em PEG) e inferior (fase rica em sal) dos sistemas de duas fases aquosas.

O ELISA é um método imunoenzimático que permite quantificar os anticorpos ou antígenos presentes em amostras biológicas. O seu princípio básico é a imobilização de um dos reagentes numa fase sólida, enquanto o outro reagente pode ser ligado a uma enzima, com a preservação da atividade biológica dos reagentes (antígenos e anticorpos) (Chaves et al., 2000).

As placas Maxisorp (Nunc), contendo 96 poços, foram previamente sensibilizadas através da adição de 100 μL de uma solução de imunoglobulina (IgG) de carneiro na concentração de 6,97 $\mu\text{g/mL}$ e incubada a 37°C durante 2 horas. Após este período as placas foram lavadas com a solução de lavagem (Salina a 0,9% m/v com Tween 20 a 0,05% v/v) por três vezes, secas e novamente incubadas a 37°C durante 1 hora com 100 μL da solução de bloqueio (Tampão fosfato salino - PBS 0,1M contendo 3% de Albumina). Terminada a segunda incubação, as placas foram novamente lavadas e secas, estando prontas para as análises.

Para a realização das análises pelo método imunoenzimático, as amostras foram colocadas nos poços da placa em duplicata e incubada a 37°C durante 1 hora, em seguida lavada e seca como descrito anteriormente. A solução contendo o conjugado (anticorpo ligado à enzima peroxidase) foi adicionada e realizou-se uma nova incubação nas mesmas condições.

Após este tempo, a placa foi lavada, seca e foi acrescentado 100 µL da solução do substrato (Orto-fenilenodiamina - OPD diluído em tampão citrato-fosfato 0,15 M acrescido de 30% de peróxido de hidrogênio), seguiu-se mais uma incubação a 37°C durante 1 hora e a reação foi interrompida pela adição de 50 µL de HCl (2,5 N). A leitura das amostras foi realizada em um leitor de microplacas no comprimento de onda 492nm.

Foi realizada uma curva padrão, com amostras de pró-toxina épsilon pura, contendo concentrações previamente estabelecidas para quantificar a atividade desta pró-toxina em amostras desconhecidas pelo método do ELISA.

V. 8-Determinação da atividade proteásica

O método para a determinação da atividade proteásica das fases aquosas foi o descrito por Leighton et al. (1973) e modificado de tal forma que a mistura de reação conteve 250 µL do substrato (azocaseína 1% (m/v) em solução tampão Tris-HCl 0,2 M, pH 7,6) e 150 µL do meio contendo a enzima. Esta mistura foi incubada por 60 minutos a 28°C, e a reação foi interrompida pela adição de 1,2 µL de ácido tricloroacético 10% (p/v) para total precipitação. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 4.000 x g. Dos sobrenadantes, foram retiradas alíquotas de 0,8 µL que foram transferidas para tubos de ensaio contendo 1,4 mL de NaOH 1M. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro com absorbância a 440 nm.

Uma unidade de atividade proteásica foi definida como sendo a quantidade de enzima requerida para produzir uma variação de absorbância igual a 1, sendo expressa em U/mL.

VI-METODOLOGIA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

Para a avaliação do processo de extração foram analisados os seguintes parâmetros:

- Aumento de pureza
- Recuperação
- Coeficiente de partição
- Balanço de massa/Atividade biológica

VI. 1-Aumento de pureza (AP)

O aumento de pureza é definido como a razão entre a atividade da biomolécula (pró-toxina ou protease) e a concentração de proteínas totais no produto final (após a extração), dividido pela mesma razão determinada para o extrato impuro.

$$AP = \frac{\left(\frac{A_{biomol}}{C_{prot}} \right)_{purificada}}{\left(\frac{A_{biomol}}{C_{prot}} \right)_{extrato.bruto}}$$

A_{biomol} = Atividade da biomolécula (mg/mL) ou (U/mL)

C_{prot} = concentração de proteína total (mg/mL)

AP = adimensional

VI. 2-Recuperação em atividade (REC)

Define-se recuperação em atividade da extração da biomolécula como:

$$REC = \frac{[A_2] \cdot 100}{[A_1]}$$

A_2 = Atividade biológica na fase obtida após extração (mg ou U/mL)

A_1 = Atividade biológica antes da extração (mg ou U/mL)
(mg ou U/mL)

REC = Recuperação (%)

As atividades biológicas A_1 e A_2 correspondem à atividade da biomolécula considerada (pró-toxina ou protease) multiplicada pelo volume da fase superior.

VI. 3-Coeficiente de Partição (K)

A distribuição da biomolécula entre as fases de um sistema bifásico aquoso é caracterizada pelo coeficiente de partição, que foi calculado pela seguinte expressão:

$$K = \frac{A_s}{A_i}$$

Onde: A_s e A_i são as atividades das biomoléculas nas fases superior e inferior, respectivamente.

VI. 4-Balanco de Massa/ Atividade Biológica

Define-se balanço de massa como:

$$\eta_a = \left\{ \frac{[A_{sup}] + [A_{inf}]}{[A_{inic}]} \right\} \cdot 100$$

A_{sup} = atividade na fase superior multiplicada pelo volume dessa fase [U],

A_{inf} = atividade na fase inferior multiplicada pelo volume dessa fase [U],

A_{inic} = atividade antes da extração multiplicada pelo volume adicionado no sistema [U].

η_a = balanço de atividade(%)

VII - RESULTADOS E DISCUSSÃO

VII. 1- Efeito do pH e da temperatura na estabilidade da pró-toxina épsilon

O conhecimento da estabilidade da molécula-alvo é muito importante, pois irá diminuir a possibilidade de desnaturação durante o processo de extração. A temperatura e o pH são as variáveis que influenciam diretamente na estabilidade da molécula e em função disso, foram realizados estudos sobre o efeito destes parâmetros.

As variações de pH alteram o estado iônico das cadeias laterais de aminoácidos, alterando, portanto, a distribuição de cargas e a existência de ligações de hidrogênio (Voet et al., 2000). As interações não-covalentes como ligações de hidrogênio, ligações hidrofóbicas e interações eletrostáticas, que mantêm a estrutura tridimensional de uma proteína são fracas, não sendo, por isso, surpreendente o fato de que ela pode ser facilmente desfeita. Em valores extremos de pH as interações eletrostáticas que normalmente estabilizariam a forma funcional nativa da proteína estariam reduzidas de modo drástico levando à desnaturação (Campbel, 2000).

Através do estudo da estabilidade, como apresentado na Figura 5, verifica-se que a pró-toxina épsilon mantém-se estável durante 24 horas na faixa de pH de 4,0 a 7,0. Nos tempos de estocagem maiores que 24 horas, a pró-toxina apresentou uma redução na sua atividade em média de 51,5% nos valores de pH acima de 6,0. Nos valores de pH iguais ou menores que 6,0, a redução na atividade foi em média de 21,2%.

Figura 5- Curva de estabilidade ao pH da pró-toxina épsilon presente no meio fermentado, realizada a temperatura de 5°C.

As proteínas podem ser desnaturadas em função da temperatura. Um aumento da temperatura favorece vibrações no interior da molécula e a energia dessas vibrações pode tornar-se grande o suficiente para desfazer a estrutura terciária (Campbel, 2000).

Como se pode verificar na Figura 6, a pró-toxina apresentou-se estável na faixa de temperatura proposta no planejamento estatístico (5,0; 15,5 e 26,0°C), durante 24 horas a pH 7,0. Após 24 horas, um comportamento de declínio da atividade da pró-toxina épsilon foi observado para as três temperaturas estudadas, que pode ser explicado pela hipótese da degradação proteolítica da pró-toxina, uma vez que não foram adicionados inibidores de proteases ao meio e esta variação de temperatura não proporcionaria uma mudança conformacional da proteína. É importante ressaltar que não se adicionou inibidor de proteases para evitar a incorporação de compostos que poderiam comprometer as etapas posteriores de purificação da pró-toxina assim como sua utilização na forma de vacina.

A causa da degradação da pró-toxina épsilon é pouco conhecida. Além da possibilidade de desnaturação por enzimas proteolíticas, a pró-toxina pode ser naturalmente instável. Porém, não há suporte científico para essa suposição, conforme mencionado por Parreiras (2001). Estes estudos mostraram que durante o processo de extração, processado em geral num período inferior a 24 horas, foi conduzido dentro de uma faixa segura de pH e temperatura.

Figura 6 - Curva de estabilidade térmica da pró-toxina épsilon presente no meio fermentado no pH 7,0.

VII. 2-Curvas Binodais PEG/citrato utilizando água

A seguir são apresentadas as curvas binodais constituídas por polietilenoglicol (PEG) e citrato de sódio/ácido cítrico com as variações: de pH e massa molar do PEG, na temperatura de $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Através das curvas binodais mostradas nas figuras 7, 8, 9 e 10 pode-se observar os comportamentos das curvas binodais, as quais utilizaram o modelo binodal para a construção das mesmas.

Guan & Lilley (1993) utilizaram métodos oriundos da geometria analítica para propor uma expressão para a curva binodal em função do volume excluído e a expressão matemática final obtida está na equação 1:

$$\ln \left(\langle V^* \rangle_{210} \frac{w_2}{\langle M_{rms} \rangle_2} \right) + \langle V^* \rangle_{210} \frac{w_1}{\langle M_{rms} \rangle_1} = 0 \quad (\text{Eq.1})$$

$\langle V^* \rangle_{210}$ - Volume excluído
 M_{rms} - Raiz quadrada da massa molar
 w - fração mássica
 1 - componente PEG
 2 - componente citrato

em que w é a fração mássica e $\langle V^* \rangle_{210}$, o volume excluído efetivo do soluto 2 em uma solução do soluto 1 no solvente 0. Isto é, a concentração de um componente soluto é função contínua da concentração de outro componente soluto em um sistema binário. A simplicidade inerente ao modelo é muito atrativa para o uso prático. Isto tem sido mostrado que, para a maior parte dos SDFA usados na purificação de biomoléculas, o modelo pode reproduzir satisfatoriamente os resultados experimentais (Guan & Lilley, 1993).

A seguir estão alguns exemplos de curvas binodais, nas quais foi aplicado o modelo binodal. Pela equação matemática descrita anteriormente determinam-se os valores dos volumes excluídos para as curvas binodais trabalhadas (Figuras 7 e 8).

Figura 7 - Curva binodal para o sistema PEG 8000/citrato de sódio a pH 6,0.

Figura 8 - Curva binodal para o sistema PEG 3350/Citrato de sódio a pH 6,0.

Observando as Figuras 7 e 8, verifica-se que o modelo aplica-se perfeitamente às curvas binodais compostas por PEG e citrato. As diferenças entre as curvas em função da massa molar e pH foram avaliadas através dos dados do volume excluído, que estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 - Resultados dos volumes excluídos calculados através do modelo binodal.

Pol. / pH	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0
400	14,63	14,92	15,21	15,37	15,44
550	25,48	26,21	26,20	26,12	25,93
1000	26,60	26,84	26,90	26,98	27,17
1500	31,60	32,20	31,30	32,37	32,34
3350	42,51	43,25	43,51	43,52	43,61
8000	57,18	58,06	57,22	58,59	58,78

Os resultados apresentados na Tabela 8 mostram que o volume excluído aumenta na medida em que a massa molar do PEG aumenta, ou seja, quanto maior a massa molar do polímero menor o volume disponível para a solubilização na fase polimérica. Em relação ao pH não houve mudanças significativas no valor do volume excluído, ou seja, as binodais permaneceram muito próximas mesmo com a variação do pH.

As curvas construídas com as massas molares fixas do PEG e variando os valores de pH foram semelhantes para os vários valores de pH (Figura 9). Estes resultados corroboram com os mostrados por Marcos et al. (1999) e Esmanhoto (2002). Marcos et al. (1999) construíram curvas binodais para o PEG 1000/citrato de sódio nos valores de pH 5,9, 6,9 e 7,6, e verificaram que para os diversos valores de pH elas eram similares. Esmanhoto (2002) observou que as curvas binodais de PEG/citrato não apresentaram variação em relação ao pH, provavelmente pelo fato de que valores estavam fora da faixa tamponante do sal citrato de sódio (pH 3,0 a 6,2), ou seja, não há variação na força iônica do sistema a ponto de deslocar a curva binodal.

Figura 9 - Curva binodal para o sistema PEG 400/Citrato de sódio com água em diferentes valores de pH e temperatura de $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

As curvas que foram construídas com valores fixos de pH e variando a massa molar do PEG (Figura 10) mostraram que com o aumento da massa molar do PEG há deslocamento da curva binodal para a esquerda, no sentido das menores concentrações dos componentes que formam os sistemas de fases em todos os valores de pH. Estes resultados são semelhantes aos apresentados por Vernau & Kula, 1990; Marcos et al., 1999; Oliveira et al., 2001 e Esmanhoto, 2002.

Figura 10 - Curva binodal para o sistema PEG/citrato de sódio a pH 6,0 com água em diferentes massas molares de PEG e temperatura de $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

As variações nas curvas binodais apresentadas em comparação com àquelas relatadas na literatura podem ser consideradas apenas desvios experimentais, assim como as curvas também apresentaram relevante aproximação com os resultados obtidos neste trabalho e os artigos citados anteriormente.

VII.3-Curvas binodais PEG/Citrato utilizando meio fermentado com pró-toxina épsilon

As curvas binodais com o meio fermentado contendo a pró-toxina épsilon foram realizadas da mesma forma que as anteriores, mas houve a substituição da água pelo meio fermentado. O propósito da realização dessas curvas foi verificar se havia alguma influência do meio fermentado na composição do sistema e conseqüentemente no perfil das curvas binodais, uma vez que as extrações não seriam feitas com água e sim com esse meio fermentado.

As curvas nos gráficos também foram construídas com as massas molares de PEG e pH. Através dos resultados obtidos, verificou-se que as curvas binodais construídas com meio fermentado contendo pró-toxina épsilon seguem o mesmo perfil das curvas construídas com água, ou seja, quanto maior a massa molar do polímero, menor a concentração necessária para

a formação das fases. Isso significa que a curva binodal desloca-se também no sentido da região monofásica à medida que a massa molar do polímero aumenta.

As curvas binodais também não se deslocam quando variam os valores de pH, apresentando-se similares no diversos valores de pH, tanto nas curvas realizadas com água quanto nas com meio fermentado. Observando a Figura 11, que mostra uma comparação entre as curvas realizadas com água e com o meio fermentado, verifica-se um deslocamento da curva realizada com o meio fermentado para a esquerda, ou seja, para os menores valores de concentração dos componentes formadores das fases.

Figura 11 - Curvas binodais relacionando as massas molares do PEG das curvas preparadas com água e as com meio fermentado contendo a pró-toxina épsilon a pH 6,0 a temperatura de $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

O deslocamento para a esquerda da curva com meio fermentado sugere que os sais ou outros componentes presentes no caldo fermentado interferem no sistema ampliando assim a região de trabalho em relação à curva construída com água, haja vista que o caldo fermentado neste caso apresenta $160,6\text{ }\mu\text{g/mL}$ de proteína, uma densidade de $1,01\text{ mg/mL}$ e uma condutividade elétrica de $10,12\text{ }\mu\text{S}$. Os sólidos solúveis adicionados junto com o meio fermentado estão se somando ao sal e ao PEG presentes no sistema de tal forma que o teor total de sólidos é diferente e maior do que aquele com a curva construída com água.

Este mesmo efeito de deslocamento da curva foi descrito por Veide et al. (1984) nos estudos efetuados com a enzima β -D-galactosidase obtida do cultivo de *Escherichia coli* e também por Rito-Palomares & Cueto (2000) que estudaram a influência se suspensões

biológicas na posição da curva binodal em sistemas de duas fases aquosas (SDFA). Outra explicação para tal comportamento pode ser a sensibilidade do SDFA nas concentrações próximas à curva binodal, o qual exibe uma evidente sensibilidade para as mudanças na composição do sistema. Pequenas mudanças na composição de PEG e sais causados por diferentes fatores (neste caso pela adição de suspensão biológica) resultam em grandes mudanças na sua composição e nas características finais do sistema de duas fases aquosas (Rito-Palomares & Cueto, 2000).

Rito-Palomares & Cueto (2000) observaram um deslocamento da curva binodal de sua origem no ponto crítico do diagrama de fases construído na presença de caldo fermentado de *Trichoderma harzianum*. Tal comportamento da curva foi explicado pela alta viscosidade causada pela presença de bio-polímeros produzidos durante a fermentação, que faz uma contribuição crítica para o sistema e reduz a quantidade de reagentes necessários para a formação das duas fases.

VII. 4-Extração da pró-toxina épsilon pelo sistema de duas fases aquosas

Como descrito anteriormente, os estudos iniciais de extração por sistemas de duas fases aquosas da pró-toxina épsilon foram realizados com auxílio de um planejamento experimental fracionário do tipo 2^{8-3} (Barros Neto et al., 2002), uma importante ferramenta matemática para a interpretação dos resultados, principalmente quando o número de variáveis é muito alto.

As concentrações de PEG e de citrato utilizadas no planejamento experimental, em relação às curvas binodais dos sistemas utilizados no referido planejamento, são mostradas na Figura 12 (símbolo: triângulo cheio). Os pontos destacados mostram, nitidamente, a limitação que um estudo de extração tem quando se utiliza um planejamento experimental.

Está claro que as diferenças nas concentrações de PEG e citrato, entre os valores mínimos e máximos, não podem variar muito, pois se corre o risco de vários pontos da matriz do planejamento permanecerem na região monofásica do diagrama. Neste caso, observa-se que dois pontos do planejamento experimental, referentes às concentrações mínimas de PEG e citrato dos sistemas, apresentam-se abaixo da curva binodal, ou seja, estão localizados na região monofásica para os sistemas com PEG de massa molar 400. Isto foi confirmado através dos dados experimentais, pois nas referidas concentrações os sistemas permaneceram monofásicos.

Figura 12 - Curvas binodais dos sistemas utilizados no planejamento experimental fracionário com as massas molares de PEG (400, 3350 e 8000g/mol) e valores de pH (6,0; 7,0 e 8,0) a temperatura de $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. ▲ - pontos do planejamento experimental.

Em alguns outros casos (20% de PEG e 20% de citrato) onde teoricamente os sistemas seriam bifásicos, não ocorreu formação das fases, devido à não solubilização dos sais. Isso ocorreu porque houve supersaturação do meio e o tempo de agitação do tubo pré-determinado de 1 minuto pode ter sido insuficiente para garantir essa solubilização. Isto foi observado visualmente nos casos em que houve alta concentração dos sais, citrato de sódio (20%) e NaCl (10%). Além dos sais, há o PEG que contribui para a dificuldade na solubilização dos sólidos.

Os resultados do planejamento experimental fracionário (Tabela 9) foram analisados estatisticamente como apresentados nas Figuras de 13 a 15.

Tabela 9 – Resultados do planejamento fracionário 2⁸⁻³ para extração da pró-toxina épsilon.

Extrações*	MMPEG (g/mol)	CPEG (%m/m)	Citrato (% m/m)	pH	NaCl (%m/m)	Fator de diluição	T (°C)	MTS (g)	K	REC %	Balanço (%)	AP
1	400	20	15	6	0	4	5	10	-	-	-	-
2	8000	20	15	6	0	SD	26	10	0,53	150,7	469,2	20,9
3	400	24	15	6	0	SD	26	3	-	-	-	-
4	8000	24	15	6	0	4	5	3	554,67	36,8	36,9	27,4
5	400	20	20	6	0	SD	5	3	1,16	132,4	255,9	1,4
6	8000	20	20	6	0	4	26	3	1,65	77,3	124,1	10,6
7	400	24	20	6	0	4	26	10	1933,4	176,9	177,7	7,6
8	8000	24	20	6	0	SD	5	10	18,34	210,7	222,7	5,6
9	400	20	15	8	0	4	26	3	-	-	-	-
10	8000	20	15	8	0	SD	5	3	0,96	107,7	305,8	0,6
11	400	24	15	8	0	SD	5	10	-	-	-	-
12	8000	24	15	8	0	4	26	10	5,61	141,4	163,4	10,4
13	400	20	20	8	0	SD	26	10	3,35	96,5	126,7	0,9
14	8000	20	20	8	0	4	5	10	0,13	22,2	153,9	31,4
15	400	24	20	8	0	4	5	3	1549,9	123,4	123,4	12,8
16	8000	24	20	8	0	SD	26	3	6,82	4,9	5,7	10,0

MMPEG-Massa molar do PEG; CPEG-Concentração de PEG; MTS-Massa total do sistema; REC-Recuperação em atividade biológica e AP-Aumento de pureza.

Extrações*	MMPEG (g/mol)	CPEG (%m/m)	Citrato (% m/m)	pH	NaCl (%m/m)	Fator de diluição	T (°C)	MTS (g)	K	REC %	Balanço (%)	AP
17	400	20	15	6	10	4	5	3	1,298	113,7	208,6	8,4
18	8000	20	15	6	10	SD	26	3	7,62	241,2	288,6	8,6
19	400	24	15	6	10	SD	26	10	-	-	-	-
20	8000	24	15	6	10	4	5	10	2,78	192,4	233,9	13,7
21	400	20	20	6	10	SD	5	10	-	-	-	-
22	8000	20	20	6	10	4	26	10	61,52	155,2	158,9	5,7
23	400	24	20	6	10	4	26	3	-	-	-	-
24	8000	24	20	6	10	SD	5	3		436,6		9,1
25	400	20	15	8	10	4	26	10	-	-	-	-
26	8000	20	15	8	10	SD	5	10	36,95	307,4	314,2	12,2
27	400	24	15	8	10	SD	5	3	-	-	-	-
28	8000	24	15	8	10	4	26	3	11,18	206,4	223,4	2,1
29	400	20	20	8	10	SD	26	3	-	-	-	-
30	8000	20	20	8	10	4	5	3	649,7	69,6	69,6	0,8
31	400	24	20	8	10	4	5	10	-	-	-	-
32	8000	24	20	8	10	SD	26	10	4041,	511,8	511,8	9,2
33	3350	22	17,5	7	5	2	15,5	6,5	2432,	143,7	143,8	8,4
34	3350	22	17,5	7	5	2	15,5	6,5	31,46	185,9	189,4	5,7
35	3350	22	17,5	7	5	2	15,5	6,5	17,86	205,1	211,6	5,3

Figura 13 - Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável-resposta a recuperação da pró-toxina épsilon na fase superior do sistema de duas fases aquosas, utilizando 8 variáveis em dois níveis. Os significados dos símbolos na ordenada da figura são: (A)MMPEG- massa molar do PEG, (B)CPEG- concentração do PEG, (C)Citrato- concentração de citrato, (D)pH- valor de pH, (E)NaCl- concentração de NaCl, (F)F Diluição- Fator de diluição do meio fermentado, (G)Temperatura- temperatura de extração e (H)MTS- massa total do sistema.

Observa-se na Figura 13 a significância dos oito fatores ou variáveis trabalhadas no planejamento, assim como as interações entre eles. As variáveis e as interações estão representados por siglas e letras no eixo vertical. Verifica-se ainda que nenhum fator ou interação foi significativa para a recuperação, pois os valores do efeito estimado estão abaixo do nível de significância $p = 0,05$.

A análise da significância das variáveis estudados em relação à recuperação será novamente investigada, pois como se trata de um planejamento experimental fracionário, existem muitas interferências bem como as diversas interações agindo em conjunto. Isso pode mascarar os efeitos reais.

A mesma análise estatística foi realizada, mas tendo como resposta o aumento de pureza na fase superior do sistema de duas fases aquosas PEG/citrato, como apresentado na Figura 14.

Figura 14 - Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável de resposta o aumento de pureza da pró-toxina épsilon na fase superior do sistema de duas fases aquosas, utilizando 8 variáveis em dois níveis. Os significados dos símbolos na ordenada da figura são: (A)MMPEG - massa molar do PEG, (B)CPEG - concentração do PEG, (C)Cittrato - concentração de citrato, (D) pH- valor de pH, (E)NaCl - concentração de NaCl, (F)F.Diluição - fator de diluição do meio fermentado, (G)Temperatura- temperatura de extração e (H)MTS- massa total do sistema.

Através dos resultados apresentados na Figura 14, observa-se que as variáveis e as interações entre eles apresentam um efeito estatisticamente significativo para o aumento de pureza, pois os valores de efeito estimado estão acima do nível de significância $p=0,05$. As interações da concentração de citrato (C) e o pH (D), da massa total do sistema (H) e o pH (D), juntamente com as variáveis MTS (H) e MMPEG (A) possuem um efeito positivo para o aumento de pureza.

Já as variáveis concentração de cloreto de sódio (E), pH (D), temperatura (G), juntamente com a interação do CPEG (B) e MTS (H) possuem um efeito estimado negativo para o aumento de pureza. Vale salientar que os efeitos estimados para um planejamento experimental fracionário necessitam de confirmações através de um planejamento experimental completo.

Figura 15 - Representação gráfica tridimensional da relação entre as respostas: coeficiente de partição (valores em logaritmo), aumento de pureza e recuperação da pró-toxina épsilon na fase superior do sistema.

A representação gráfica da relação entre as três respostas está apresentada na Figura 15. A melhor combinação das respostas é aquela apresentada pelos sistemas de número 20 e 2, obtendo 13,7 e 20,9 de aumento de pureza respectivamente. Estes sistemas apresentaram como características comuns à massa molar do PEG (8000), concentração de citrato de sódio (15% m/m), massa total do sistema (10g) e pH (6,0). Isto não significa que estas condições sejam as melhores para a purificação, pois por se tratar de um planejamento fracionário, o objetivo é apenas uma seleção das variáveis que influenciam significativamente para estudos posteriores de otimização.

VII. 5 -Extração da protease (tripsina) em sistemas de duas fases aquosas (SDFA)

Devido ao não fornecimento do material necessário para a dosagem da pró-toxina épsilon, optou-se por trabalhar com outro componente presente no meio fermentado, ou seja, uma protease (tripsina) e realizar estudos de partição e purificação em sistema de duas fases aquosas PEG/citrato utilizando um planejamento experimental fatorial completo 2^4+4 (Barros-Neto et al., 2002).

Após as extrações, foi realizada a análise estatística dos resultados, na qual os efeitos das variáveis sobre as 3 respostas foram analisados. Os resultados obtidos no planejamento estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 – Resultados do planejamento 2⁴ da extração de protease na fase superior do sistema.

Extrações*	MMPEG	CPEG%	pH	Citrato %	K	Log K	REC %	AP
1	400	20	6,0	15,0				*
2	8000	20	6,0	15,0	0,62	-0,21	37,03	2,60
3	400	24	6,0	15,0				*
4	8000	24	6,0	15,0	1,11	0,05	65,92	1,49
5	400	20	8,0	15,0				*
6	8000	20	8,0	15,0	0,87	-0,06	115,08	2,59
7	400	24	8,0	15,0				*
8	8000	24	8,0	15,0	1,08	0,04	115,96	2,69
9	400	20	6,0	20,0	6,41	0,81	153,15	1,67
10	8000	20	6,0	20,0	2,87	0,46	82,61	1,28
11	400	24	6,0	20,0	29,25	1,47	145,48	1,57
12	8000	24	6,0	20,0	1,97	0,29	57,07	0,91
13	400	20	8,0	20,0	17,93	1,25	193,77	1,73
14	8000	20	8,0	20,0	3,14	0,50	109,01	1,73
15	400	24	8,0	20,0	16,35	1,21	206,34	2,16
16	8000	24	8,0	20,0	2,54	0,40	117,46	2,51
17 (C)	3350	22	7,0	17,5	2,34	0,37	97,50	2,83
18 (C)	3350	22	7,0	17,5	2,38	0,38	122,62	2,30
19 (C)	3350	22	7,0	17,5	1,82	0,26	114,29	2,13
20 (C)	3350	22	7,0	17,5	2,55	0,41	123,92	2,48

* A ordem realizada foi aleatória. MMPEG-Massa molar do PEG, CPEG-Concentração de PEG, Citrato-Concentração de citrato, K-Coefficiente de partição, REC-Recuperação na fase superior do sistema e AP-Aumento de pureza na fase superior do sistema.* Não ocorreu formação das fases.

Para a análise da resposta coeficiente de partição, foi utilizado o valor em logaritmo, pois por se tratar de uma fração, apresentou uma variabilidade nos seus valores e o uso do logaritmo minimizou essa variação.

O gráfico de Pareto representa os efeitos estimados das variáveis e das interações no aumento de pureza em ordem decrescente de magnitude (Figuras 16, 18 e 20). O comprimento de cada barra é proporcional ao efeito padronizado. A linha vertical pode ser usada para julgar quais os efeitos são estatisticamente significantes. As barras que se estendem através desta linha correspondem aos efeitos estatisticamente significantes com um nível de confiança de 95%.

Na análise dos efeitos das variáveis verifica-se que os dois maiores efeitos significativos foram concentração de citrato (D) e a interação entre a massa molar do PEG (A) e a concentração de citrato (D), apresentando efeitos negativo e positivo, respectivamente (Figura 16). Isto significa que o aumento da concentração de citrato com concomitante diminuição da massa molar do PEG favorece o coeficiente de partição.

Figura 16 - Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável-resposta o coeficiente de partição, utilizando 4 variáveis em dois níveis e um erro igual a 0,004. Os significados dos símbolos na ordenada da figura são: (A)MMPEG- massa molar do PEG, (B)CPEG- concentração do PEG, (C) pH- valor de pH, (D)Citrato- concentração de citrato.

Observa-se ainda que, muitas outras variáveis apresentaram efeitos significantes ao nível de $p = 0,05$, ou seja, 95% de confiabilidade nos casos. A massa molar do PEG foi significativa, mas o seu efeito foi três vezes menor que o efeito da concentração do citrato. A análise de variância (ANOVA) foi feita considerando todos os efeitos apresentados na Figura 16. O alto valor do coeficiente de determinação ($R^2 = 0,996$) indica que o modelo linear é adequado para este estudo e as características do fenômeno da partição foram descritas, indicando as principais variáveis importantes no processo (Tabela 11).

Tabela 11 – Análise de variância para as variáveis em modelo linear.

Variáveis	SQ	GL	MQ	F	p
(A)MMPEG	0,077	1	0,077	19,0	0,022
(B)CPEG	0,117	1	0,117	28,9	0,013
(C)pH	0,014	1	0,014	3,4	0,163
(D)Citrato	0,833	1	0,833	206,4	0,001
A*B	0,096	1	0,096	23,7	0,017
A*C	0,000	1	0,000	0,1	0,820
A*D	0,224	1	0,224	55,4	0,005
B*C	0,092	1	0,092	22,8	0,017
B*D	0,046	1	0,046	11,3	0,044
C*D	0,000	1	0,000	0,0	0,949
Erro puro	0,012	3	0,004		
Total SQ	3,483	15			

Os melhores valores de coeficiente de partição foram obtidos nos sistemas com massa molar do PEG de 400 (g/mol) e concentração de citrato de 20% (m/m). O maior valor de coeficiente de partição obtido foi de 29,2 com o logaritmo de 1,46.

Estes resultados são semelhantes aos apresentados por Alves et al. (2000) os quais obtiveram valores de coeficiente de partição de $22,4 \pm 1,7$ em média para a insulina em sistemas PEG/citrato, mas foi observado um aumento do coeficiente de partição (K) com a elevação da massa molar do PEG, o que foi oposto ao obtido neste trabalho.

Figura 17 – Gráfico cúbico das variáveis (concentração de citrato, concentração de PEG, massa molar do PEG e pH no ponto central) em função da resposta coeficiente de partição.

A Figura 17 representa um cubo, no qual as três principais variáveis estão correlacionadas (MMPEG, CPEG e Citrato). Esta análise relaciona as variáveis para a resposta coeficiente de partição, a melhor condição encontrada para as três variáveis foi obtida com a MMPEG de 400 (g/mol), CPEG de 24% (m/m) e Citrato de 20% (m/m).

Os comportamentos apresentados pela literatura são semelhantes aos obtidos neste trabalho. Oliveira et al. (2003), que estudaram o comportamento da partição da hexoquinase em SDFA com sistemas PEG/citrato, verificaram que baixas massas molares do PEG (400 g/mol) e

altas concentrações de citrato (20%) promoveram altos valores de coeficiente de partição da enzima hexoquinase produzida por *S. cerevisiae*.

Em relação à recuperação foram feitas as mesmas análises e observações antes descritas, como o efeito das variáveis significativas e a melhor condição para a recuperação da protease na fase superior do sistema de extração. Observando o gráfico de Pareto (Figura 18) verificamos que as duas variáveis principais, concentração de citrato (D) e pH (C), apresentaram efeitos significantes com nível de confiança de 95%. Outro efeito significativo verificado foi o da interação entre as variáveis (A x D) como também observado para o K. Os efeitos positivos do citrato e do pH significam que com o aumento do valor dessas variáveis aumenta a recuperação da protease. Já a interação (A x D) negativa entre os seus efeitos indica que o aumento da concentração de citrato juntamente com a diminuição simultânea da MMPEG favorece a recuperação. A curvatura também foi significativa, isto ocorre quando o modelo só é ajustado através de uma equação quadrática.

Figura 18 - Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável-resposta a recuperação, utilizando 4 variáveis em dois níveis. Os significados dos símbolos na ordenada da figura são: (A)MMPEG- massa molar do PEG, (B)CPEG- concentração do PEG, (C) pH- valor de pH, (D) Citrato- concentração de citrato.

Estes resultados podem ainda ser observados na Figura 19. A MMPEG de 400 (g/mol) juntamente com a concentração de citrato de 20% (m/m) apresentaram os melhores valores de recuperação, todos acima de 100%. Valores de recuperação acima de 100% são frequentemente

reportados para extração enzimática usando extração líquido-líquido. Estes altos valores de recuperação são provavelmente explicados pela eliminação dos inibidores durante o processo de purificação e pela composição do sistema que favorece a atividade enzimática (Mayerhoff et al., 2004).

Esmanhoto & Kilikian (2004) que utilizaram SDFA com PEG/fosfato para extração do antibiótico rentamicina e um planejamento experimental 2^4 , os quais obtiveram uma recuperação de 91,3%, que é semelhante ao nosso trabalho, mas o coeficiente de partição de 8,2 foi diferente do obtido neste trabalho.

Figura 19 – Diagrama para interpretação geométrica dos efeitos de um planejamento 2^4 , tendo como variável-resposta a recuperação para analisar a concentração de citrato em função da massa molar do PEG.

Os melhores resultados para recuperação da protease (206,3%) foram obtidos com MMPEG de 400 (g/mol), CPEG de 24% (m/m), Citrato de 20% (m/m) e pH de 8,0. Os resultados apresentados por Cisneiros et al. (2004) para extração de luteína, oriunda de microalga verde (*Chlorella protothecoides*), foram obtidos com os sistemas de extração de massa molar do PEG de 8000 (g/mol) e concentração de 22% (m/m), concentração de fosfato de 10,3% e pH 7,0, os quais atingiram 81% de recuperação da luteína. Estes resultados diferem dos obtidos neste trabalho, pois foi a maior massa molar do PEG que atingiu o melhor desempenho.

Outra variável-resposta importante no processo de extração foi o aumento de pureza. Foram realizadas as mesmas análises de efeitos significantes para esta resposta.

Figura 20 - Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável-resposta o aumento de pureza, utilizando 4 variáveis em dois níveis e um erro igual a 0,090. Os significados dos símbolos na ordenada da figura são: (A)MMPEG- massa molar do PEG, (B)CPEG- concentração do PEG, (C) pH- valor de pH, (D) Citrato- concentração de citrato.

Pode ser observado na Figura 20 que apenas os efeitos principais, massa molar do PEG (A) e concentração de citrato (D), foram significantes. Em adição, uma significativa interação entre estas duas variáveis (A x D) foi também observada. O efeito negativo da interação significa que uma diminuição na MMPEG com simultâneo aumento na concentração de citrato leva a altos valores de aumento de pureza.

O melhor valor do aumento de pureza (2,69) foi obtido no sistema com a seguinte característica: MMPEG de 8000 (g/mol), CPEG de 24% (m/m), pH 8,0 e Citrato de 15% (m/m). Além do mais, este sistema apresenta recuperação acima de 100%.

Estudos realizados por Mayerhoff et al. (2004) mostraram os efeitos das variáveis sobre o aumento de pureza da xilose redutase de *Candida mogii*, os quais apresentaram também a massa molar do PEG como efeito significativo, mas o efeito foi negativo. Os autores atingiram um aumento de pureza de 1,24 com um sistema de massa molar do PEG de 1500, concentração de PEG de 22% (m/m), concentração de fosfato de 10% (m/m) e sem adição de NaCl, utilizando um planejamento experimental 2^4 .

Figura 21 – Diagrama para interpretação geométrica dos efeitos de um planejamento 2^4 , tendo como variável-resposta o aumento de pureza para analisar a concentração de citrato em função da massa molar do PEG.

Verifica-se que a diminuição da concentração de citrato com o concomitante aumento da massa molar do PEG favorece o aumento de pureza (Figura 21). Este comportamento é contrário ao da recuperação, então se fez a opção de tentar melhorar a variável-resposta aumento de pureza, já que a maioria das extrações apresentava recuperação acima de 100%. Para isso foram feitas análises das características dos sistemas que apresentaram melhor desempenho de extração.

Observando a Figura 22, foi possível selecionar os sistemas que apresentaram melhor desempenho de extração e escolher quais os novos parâmetros a serem estudados em um outro planejamento (2^4).

Figura 22 – Distribuição dos sistemas de extração em relação ao AP e REC na fase superior.

Cada sistema foi analisado separadamente em relação aos níveis das variáveis para que fossem escolhidos outros limites para cada variável a ser utilizada em um segundo planejamento na tentativa de melhorar o processo de extração e purificação em sistemas de duas fases aquosas.

Os sistemas que estão selecionados dentro dos círculos, são aqueles que apresentaram melhor desempenho para as respostas aumento de pureza e recuperação, mas como o objetivo do trabalho foi melhorar os valores do aumento de pureza, os parâmetros das variáveis estudadas foram mudados e estão apresentados na Tabela 12, juntamente com os resultados obtidos deste segundo planejamento.

Tabela 12 - Resultados do segundo planejamento 2⁴ da extração de protease na fase superior do sistema.

Extrações*	MMPEG	CPEG%	pH	Citrato %	K	REC (%)	AP
1	1500	22	7	12	1,827	123,8	1,16
2	10000	22	7	12	0,419	56,3	3,18
3	1500	26	7	12	5,308	254,6	2,60
4	10000	26	7	12	0,674	82,5	2,34
5	1500	22	8	12	2,402	218,3	2,31
6	10000	22	8	12	0,392	67,2	4,88
7	1500	26	8	12	3,123	223,6	2,33
8	10000	26	8	12	0,552	100,4	3,32
9	1500	22	7	18	3,667	156,6	1,79
10	10000	22	7	18	2,057	79,3	1,49
11	1500	26	7	18	2,065	107,9	0,98
12	10000	26	7	18	1,552	85,1	1,12
13	1500	22	8	18	4,410	170,9	1,61
14	10000	22	8	18	1,608	96,2	1,71
15	1500	26	8	18	3,471	212,8	2,27
16	10000	26	8	18	1,173	101,8	1,70
17 (C)	3350	24	7,5	15	1,471	136,0	2,62
18 (C)	3350	24	7,5	15	1,479	140,3	2,45
19 (C)	3350	24	7,5	15	1,310	106,9	2,73
20 (C)	3350	24	7,5	15	1,432	119,2	2,20

* A ordem realizada foi aleatória. MMPEG-Massa molar do PEG, CPEG-Concentração de PEG, Citrato-Concentração de citrato, K-Coefficiente de partição, REC-Recuperação na fase superior do sistema e AP-Aumento de pureza na fase superior do sistema.

Para o segundo planejamento foram analisadas também as três variáveis-respostas (coeficiente de partição – K, Recuperação e Aumento de pureza), as quais apresentaram comportamentos similares aos obtidos no planejamento anterior.

Observa-se que a massa molar do PEG influencia significativamente a partição, pois com menores valores de MMPEG a partição aumenta (Tabela 12). Este comportamento é justificado pela teoria do volume excluído, pois quanto maior a massa do polímero menor será o espaço ou volume livre na solução e é neste espaço para onde as moléculas particionam. Então em grandes massas molares, o volume excluído aumenta e conseqüentemente diminui a partição das biomoléculas para a fase rica em polímero.

Li & Peebles (2004) citam que um aumento na massa molar do polímero causa a partição do biomaterial para a outra fase, pois o aumento da massa molar do polímero diminui a quantidade de solvente na fase rica em polímero que é capaz de solubilizar a enzima e o sal.

Figura 23 - Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável-resposta o coeficiente de partição, utilizando 4 variáveis em dois níveis e um erro igual a 0,006. Os significados dos símbolos na ordenada da figura são: (A)MMPEG- massa molar do PEG, (B)CPEG- concentração do PEG, (C) pH- valor de pH, (D) Citrato- concentração de citrato.

Na análise dos efeitos das variáveis verifica-se que os dois maiores efeitos significativos foram a massa molar do PEG (A) e a interação entre a concentração de PEG e a concentração de citrato (BxD), ambos com efeito negativo (Figura 23). Isto significa que a diminuição da massa molar do PEG favorece o coeficiente de partição, além do mais a diminuição da concentração de citrato com concomitante aumento da concentração do PEG também favorece o coeficiente de partição.

Estas análises podem ser confirmadas através do gráfico cúbico (Figura 24), o qual apresenta a relação entre as variáveis que apresentam maior significância nos efeitos estudados para a extração da protease em sistemas de duas fases aquosas.

Figura 24 - Gráfico cúbico das variáveis (concentração de citrato, concentração de PEG, massa molar do PEG e pH no ponto central) para a resposta coeficiente de partição.

A Figura 24 representa um cubo, no qual estão as variáveis principais relacionadas (MMPEG, CPEG e Citrato). Este gráfico relaciona as variáveis para a resposta coeficiente de partição, a melhor condição encontrada para as três variáveis foi obtida com a MMPEG de 1500 (g/mol), CPEG de 26% (m/m) e Citrato de 12% (m/m). Alves et al. (2000) obtiveram um aumento no coeficiente de partição da α -lactoalbumina de 0,29 para 8,0 com o aumento da concentração do polímero no sistema PEG/fosfato, isto também foi observado no presente trabalho, no qual o maior valor de coeficiente de partição (5,3) foi obtido na maior concentração do PEG (26%).

Figura 25 – Representação gráfica das respostas aumento de pureza e recuperação para a extração em sistemas de duas fases aquosas.

Observando a Figura 25, onde está representada a distribuição dos sistemas de extração da protease em relação às duas respostas (aumento de pureza e recuperação), pode-se constatar que o sistema de extração número 6 obteve a melhor purificação (4,88), mas a recuperação foi de 67,17%. Já o sistema de extração número 8 apresentou um aumento de pureza de 3,32 e uma recuperação de 100%, ambos os sistemas obtiveram resultados satisfatórios.

Isto é comprovado pelos resultados apresentados por Mayerhoff et al. (2004) os quais obtiveram um aumento de pureza de 1,59 e recuperação de 105,8% para a enzima xilose redutase em sistemas PEG/fosfato. Resultados semelhantes foram obtidos por Li & Peeples (2004) que purificaram uma α -amilase recombinante tendo um aumento de pureza de 3,31 e 90% de recuperação utilizando sistemas de termosseparação.

Figura 26 – Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável-resposta a recuperação, utilizando 4 variáveis em dois níveis. Os significados dos símbolos na ordenada da figura são: (A)MMPEG- massa molar do PEG, (B)CPEG- concentração do PEG, (C) pH- valor de pH, (D) Citrato- concentração de citrato.

Observa-se no gráfico de Pareto (Figura 26) que a massa molar do PEG, o pH e a interação entre a massa molar do PEG e a concentração de citrato (AxD) apresentaram efeitos mais significativos. Isto significa que, quanto menor a massa molar do PEG e maior a concentração de citrato, maior será a recuperação da protease em sistemas de extração de duas fases aquosas (PEG/citrato). O pH também apresentou um efeito positivo significativo, ou seja, quanto maior o valor de pH melhor será a recuperação da enzima.

O gráfico de Pareto referente ao aumento de pureza (Figura 27) apresenta como variáveis mais significativas a concentração de citrato, o pH e a massa molar do PEG. A interação entre a massa molar do PEG e a concentração de citrato também foi significativa para o aumento de pureza, indicando que o aumento da massa molar do PEG com concomitante diminuição da concentração de citrato favorece a purificação da protease. O pH apresentou efeito semelhante ao apresentado para a recuperação, ou seja, quanto maior o valor de pH melhor será a purificação.

Figura 27- Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável-resposta o aumento de pureza, utilizando 4 variáveis em dois níveis. Os significados dos símbolos na ordenada da figura são: (A)MMPEG- massa molar do PEG, (B)CPEG- concentração do PEG, (C) pH- valor de pH, (D) Citrato- concentração de citrato.

Figura 28 - Gráfico cúbico das variáveis (concentração de citrato, concentração de PEG e massa molar do PEG) para a resposta aumento de pureza.

Figura 29 – Representação gráfica do aumento de pureza em relação à concentração de citrato e massa molar do PEG.

Observando a Figuras, 28 e 29, nota-se que a purificação ocorreu com maior eficiência nos sistemas que apresentaram MMPEG de 10000 associados à concentração de citrato de 12% (m/m), ou seja, o aumento da massa molar do polímero e diminuição da concentração do sal favorece a purificação da enzima.

Este planejamento foi direcionado para melhorar dos valores de aumento de pureza, então esta resposta foi a mais importante, pois verificamos que foi possível favorecer o aumento de pureza quando as variáveis foram alteradas com esta finalidade.

O melhor valor do aumento de pureza passou de 2,69 no primeiro planejamento para 4,88 no segundo planejamento, correspondendo a um aumento de 81,4% no valor desta resposta, ou seja, as modificações e escolhas dos parâmetros utilizados no segundo planejamento foram eficazes para incrementar a eficiência da purificação do sistema de duas fases aquosas.

Com a finalidade de melhorar o desempenho da purificação pelo sistema de duas fases aquosas realizou-se um planejamento fatorial completo do tipo 2^3 , no qual a massa molar do PEG foi fixada em 10.000 (g/mol) pela não disponibilidade de utilizar polímero de massa molar maior. Foram modificadas as outras variáveis (concentração do PEG, concentração de citrato e pH) de acordo com os resultados obtidos nos planejamentos realizados anteriormente. Os resultados deste planejamento estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 – Resultados do planejamento 2³ da extração de protease em sistemas de duas fases aquosas (PEG/citrato).

Extrações*	CPEG%	Citrato %	pH	K	REC %	AP
1	22	8	7,5	0,493	100,51	3,66
2	26	8	7,5	0,575	92,75	3,27
3	22	12	7,5	0,636	65,98	3,80
4	26	12	7,5	0,941	91,72	2,00
5	22	8	8,5	0,574	131,53	4,21
6	26	8	8,5	0,600	134,54	3,40
7	22	12	8,5	0,661	92,74	1,73
8	26	12	8,5	0,778	105,79	1,71
9 (C)	24	10	8,0	0,457	77,63	2,55
10 (C)	24	10	8,0	0,500	78,43	2,54
11 (C)	24	10	8,0	0,458	71,43	3,05
12 (C)	24	10	8,0	0,421	71,83	3,41

* A ordem realizada foi aleatória. CPEG-Concentração de PEG (%m/m), Citrato-Concentração de citrato (%m/m), K-Coefficiente de partição, REC-Recuperação na fase superior do sistema e AP-Aumento de pureza na fase superior do sistema.

Figura 30 - Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável-resposta o coeficiente de partição, utilizando 3 variáveis em dois níveis e um erro igual a 0,001. Os significados dos símbolos na ordenada da figura são: (A) CPEG- concentração do PEG, (B) Citrato- concentração de citrato e (C) pH- valor de pH.

Na análise dos efeitos das variáveis para o coeficiente de partição verifica-se que os dois efeitos mais significativos foram concentração de citrato (B) e a concentração do PEG (A), ambos apresentando efeitos positivos (Figura 30). Isto significa que o aumento da concentração

de citrato com simultâneo aumento da concentração do PEG favorece o coeficiente de partição. A interação entre as variáveis concentração do PEG e de citrato (AxB) também foi significativa. Então, a análise desta interação se fez necessária e está representada na Figura 31.

Figura 31 – Diagrama para interpretação geométrica dos efeitos de um planejamento 2^3 , tendo como variável-resposta o coeficiente de partição para analisar a concentração de citrato em função da concentração do PEG.

Pode-se dar uma interpretação geométrica aos efeitos, para isto, representa-se o planejamento experimental em um sistema cartesiano com um eixo para cada variável. Verifica-se na Figura 31 que o efeito da concentração do PEG é mais evidente quando o nível da concentração de citrato está alto. O mesmo ocorre para a concentração de citrato em relação à concentração do PEG, ou seja, a melhor condição para o coeficiente de partição ocorre quando as concentrações de PEG e de citrato estão nos seus níveis mais altos (26% e 12%, respectivamente). Este fenômeno ocorre devido à interação existente entre essas variáveis, pois cada uma delas não atua independentemente da outra, ou melhor, o efeito da concentração de PEG depende do efeito da concentração do citrato e vice-versa.

Observando a Figura 32, a qual mostra o gráfico de Pareto para a variável-resposta recuperação, verifica-se que os efeitos do pH, da concentração de citrato e da concentração de PEG foram significativos ao nível de $p=0,05$ com efeito positivo para o pH e concentração do PEG e negativo para a concentração de citrato. Além disso, a interação entre a concentração de PEG e de citrato (AxB) também foi significativa.

Figura 32 - Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável-resposta a recuperação, utilizando 3 variáveis em dois níveis. Os significados dos símbolos na ordenada da figura são: (A) CPEG- concentração do PEG, (B) Citrato- concentração de citrato e (C) pH-valor de pH.

Observando a Figura 32, verifica-se que o pH foi a variável que apresentou o efeito mais significativo para a recuperação da enzima com um efeito positivo, assim pode-se constatar que no maior nível de pH (8,5) a recuperação da enzima foi maior. Quando o maior nível de pH está associado com o menor nível da variável concentração de citrato (8%), que apresentou efeito significativo negativo, a recuperação apresentou os seus melhores valores (134,54 %).

Recuperações acima de 100% podem ser obtidas em sistemas de extração líquido-líquido, pois com o processo de purificação diminui os inibidores das enzimas, aumentando assim a sua atividade enzimática. Cortez et al. (2004) extraíram xilitol desidrogenase utilizando sistema de extração líquido-líquido com micelas reversas, obtendo 121% de recuperação da enzima e um aumento de pureza de 2,3 e Mayerhoff et al. (2004) obtiveram resultados semelhantes, utilizando sistemas de duas fases aquosas para extrair xilose redutase, os quais apresentaram um aumento de pureza de 1,89 e uma recuperação de 103,5%.

Figura 33 – Diagrama para interpretação geométrica dos efeitos de um planejamento 2^3 , tendo como variável-resposta a recuperação da enzima para analisar a concentração de citrato em função da concentração do PEG.

A Figura 33 mostra que o efeito da concentração do citrato é mais evidente quando o nível da concentração de PEG está baixo e vice-versa, ou seja, a melhor condição para a recuperação da enzima ocorre quando as concentrações de PEG e de citrato estão nos seus níveis mais baixos (22% e 8%, respectivamente).

O aumento de pureza foi a variável-resposta que se tentou otimizar através das mudanças dos níveis das variáveis nos planejamentos realizados. Então foram realizadas as análises dos efeitos significativos das variáveis sobre o aumento de pureza bem como a análise desta variável através da metodologia da superfície de resposta. Estas análises podem ser observadas nas Figuras 34 e 35.

Figura 34 - Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável-resposta aumento de pureza, utilizando 3 variáveis em dois níveis e um erro puro de 0,177. Os significados dos símbolos na ordenada da figura são: (A) CPEG- concentração do PEG, (B) Citrato- concentração de citrato e (C) pH- valor de pH.

A análise dos efeitos estimados, que estão representados no gráfico de Pareto, evidenciou que apenas a variável concentração de citrato foi significativa para o aumento de pureza ao nível de $p=0,05$ e esse efeito foi negativo, pois quanto maior for a concentração de citrato menor será a purificação da enzima.

Os melhores valores de aumento de pureza correspondem ao menor nível de citrato (8%) e também ao menor nível da concentração do PEG (22%). A maior purificação obtida nestas condições foi de 4,2 vezes e com uma recuperação da enzima de 131,5%. O valor de pH desta condição foi 8,5.

Estes resultados são compatíveis com os apresentados por Marcos et al. (2002) que aplicaram análises de superfícies de resposta para a purificação de penicilina acilase em sistemas de duas fases aquosas (PEG/citrato) e obtiveram aumentos de pureza de 5,5 vezes e recuperação de 80%. Balasubramaniam et al. (2003) recuperaram 87% da enzima lisozima em sistemas PEG/sulfato e aumento de pureza de 4 vezes. Já Rabelo et al. (2004) utilizaram sistemas de

termosseparação em sistemas de duas fases aquosas utilizando co-polímeros para purificar bromelina de abacaxi e atingiram recuperação de 79,5% e aumento de pureza de 1,25 vez.

Li & Peebles (2004) purificaram, em um único passo de extração, a enzima xilanase recombinante termoestável. Os autores obtiveram recuperação de 60 a 90% e aumento de pureza de 2,89 a 4,08 vezes. Esses resultados apresentados na literatura confirmam que os obtidos neste trabalho estão compatíveis com o grau de purificação de biomoléculas por sistemas de duas fases aquosas.

VII. 6 - Estabilidade da protease à temperatura e ao pH em função do tempo.

As curvas de termoestabilidade estão apresentadas nas figuras 35 e 36 para a protease do extrato bruto (EB) e do extrato parcialmente purificado (EPP), respectivamente. Os resultados obtidos com o extrato bruto e parcialmente purificado mostraram uma estabilidade da protease nas temperaturas de 5°C e 25°C restando em torno de 100% da sua atividade durante 48 horas. As proteases dos extratos não foram estáveis à temperatura de 40°C, apresentando 39% e 75% de sua atividade residual no extrato bruto (48 horas) e extrato parcialmente purificado, respectivamente.

Figura 35 – Estabilidade da protease presente no extrato bruto (EB) frente à temperatura em função do tempo, a pH 7,0.

Observa-se na Figura 36, que a enzima parcialmente purificada apresenta maior estabilidade em função da temperatura em relação à Figura 35, ou seja, comparada ao extrato bruto. Esta maior estabilidade da protease no extrato parcialmente purificado pode ser explicada pelo fato do PEG possuir um efeito protetor na enzima. O comportamento da enzima de ser mais estável no extrato parcialmente purificado também foi reportado por Moreira et al. (2003), que estudou uma protease alcalina de *Nocardiosis* sp., a qual foi estável quando incubada à temperatura de 40°C, restando cerca de 80% da atividade residual da enzima no extrato parcialmente purificado. A maior atividade residual da enzima foi justificada pela diminuição dos inibidores de protease que existiam no extrato impuro.

Figura 36 – Estabilidade da protease presente no extrato parcialmente purificado (EPP) frente à temperatura em função do tempo, a pH 7,0.

As curvas de estabilidade ao pH da protease estão mostradas nas Figuras 37 e 38. As proteases dos extratos brutos (EB) e parcialmente purificado (EPP) apresentaram boa estabilidade (em torno de 100% de atividade residual) no decorrer das 48 horas nos diferentes valores de pH utilizados neste trabalho. A menor retenção obtida foi de aproximadamente 80% para os valores de pH 4,0 e 5,0 nos dois extratos (EB e EPP).

Figura 37 – Estabilidade da protease presente no extrato bruto (EB) frente ao pH em função do tempo, a temperatura de 5°C.

Figura 38 – Estabilidade da protease presente no extrato parcialmente purificado (EPP) frente ao pH em função do tempo, a temperatura de 5°C.

Estes resultados estão de acordo com os dados obtidos por Souza et al. (2002) que estudaram a estabilidade ao pH de duas enzimas (hexoquinase e glicose-6-fosfato desidrogenase) as quais apresentaram boa estabilidade ao pH em função do tempo. A hexoquinase foi estável após 51 horas de estocagem aos valores de pH 6,0 e 7,5, enquanto que a glicose-6-fosfato desidrogenase foi estável a pH 7,0, 9,5 e entre pH 4,5 e 5,5. Moreira et al. (2003) também demonstraram bons níveis de estabilidade (acima de 100%) em pH alcalino para uma protease produzida por *Nocardiopsis* sp.

VIII – CONCLUSÕES

Após a realização dos experimentos, foi possível concluir que:

- A pró-toxina é estável quando estocada em temperaturas abaixo de 26°C, na faixa de pH de 4,0 a 7,0 durante 24 horas.
- O caldo fermentado contendo a pró-toxina deslocou a curva binodal no sentido das menores concentrações dos componentes do sistema. Com isso é possível trabalhar com sistemas de duas fases com menores concentrações de PEG e citrato e, portanto, de mais baixo custo.
- As curvas binodais não foram influenciadas de forma significativa pela variação do pH.
- Resultados de purificação considerados promissores foram obtidos para a pró-toxina épsilon. Nesse caso o sistema de extração que proporcionou coeficiente de partição de 0,53, aumento de pureza de 20,9 e recuperação de 150,7% foi constituído por PEG 8000 (20% m/m), citrato a 15% (m/m), pH 6,0, sem adição de NaCl, sem diluição do meio fermentado, temperatura de 26°C e massa total do sistema de 10g.
- Os melhores resultados para a extração da protease foram obtidos com o sistema de duas fases aquosas constituído por: PEG de massa molar 10000 (g/mol) e concentração a 22% (m/m); concentração de citrato de 8% (m/m); e pH 8,5. O coeficiente de partição foi de 0,57, aumento de pureza de 4,2 e a recuperação da atividade enzimática de 131% na fase superior do sistema.
- A protease permaneceu estável (durante 48 h), mesmo após a extração, nas temperaturas de 5°C e 25°C e nos valores de pH de 6,0 a 9,0.

IX- PUBLICAÇÕES GERADAS A PARTIR DA DISSERTAÇÃO

- Large scale purification of *Clostridium perfringens* toxin: a review , **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.40, n.2, 2004.
- Influência das condições de extração na pré-purificação da toxina épsilon em sistemas de duas fases aquosas utilizando PEG/Citrato. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.39, supl.3, p. 100, 2003 (Apresentado na VII Semana de Ciência e Tecnologia e XVIII Seminário de Pós-Graduação, São Paulo, 2003).
- Estudo da Partição da toxina épsilon produzida por *Clostridium perfringens* em sistemas PEG-Fosfato. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.39, supl.3, p. 95, 2003 (Apresentado na VII Semana de Ciência e Tecnologia e XVIII Seminário de Pós-Graduação, São Paulo, 2003).
- Extração de Tripsina em Sistemas de Duas Fases Aquosas PEG/Citrato. In: SEMINÁRIO DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA (ENZITEC 2004), 1, Rio de Janeiro, **Anais**, p. 176, 2004.
- Effect of fermentation broth on the position of the binodal curve in aqueous two-phase systems. In: 26TH SYMPOSIUM ON BIOTECHNOLOGY FOR FUELS AND CHEMICALS, Chattanooga, Tennessee/USA, **Program and Abstracts** , Chattanooga, p.94, 2004.
- Seleção das variáveis do Processo de Extração em Sistemas de Duas Fases Aquosas utilizando PEG/Citrato para purificação da Toxina Épsilon. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA – COBEQ, que realizar-se-á no período de 24 a 27 de setembro de 2004 em Curitiba/PR.
- Purification of protease from *Clostridium perfringens* by aqueous two-phase systems using PEG/Citrate. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. 2004 (Submetido)
- Aqueous two-phase systems applied to purification of protease from *Clostridium perfringens***. In: VIII SEMANA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA E XIX SEMINÁRIO DE PÓS-GRADUAÇÃO, que realizar-se-á em outubro de 2004 em São Paulo.
- Aqueous two-phase systems (PEG/citrate) applied to the purification of protease from *Clostridium perfringens*. In 7th **WORLD CONGRESS OF CHEMICAL ENGINEERING**, que realizar-se-á na Escócia no período de 10 a 14 de julho de 2005.

X-REFERÊNCIAS

- ALBERTSSON, P. A. **Partition of cell particles and macromolecules**. Wiley-Interscience, New York, 346 p., 1986.
- ALVES, J. G. L. F.; CHUMPITAZ, L. D. A.; SILVA, L. H. M.; FRANCO, T. T.; MEIRELLES, A. J. A. Partitioning of whey proteins, bovine serum albumin and porcine insulin in aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B**, v.743, p.235-239, 2000.
- AMORIM, C. Clostridioses - Doenças Que Mais Matam Bovinos. **Jornal do Brasil**. Publicado em 23 de maio de 2000.
- ASENJO, J.A. **Separation Processes in Biotechnology**. Marcell Dekker Inc., New York, 801p., 1990.
- BALASUBRAMANIAM, D.; WILKINSON, C.; COTT, K. V.; ZHANG, C. Tobacco protein separation by aqueous two-phase extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 989, p.119-129, 2003.
- BAMBERGER, S.; BROOKS, D. E.; SHARP, K. A.; VAN ALSTINE, J. M.; WEBBER, T. J. "Preparation of phase system and measurent of their physicochemical properties. In: BROOKS, D. E.; WALTER, H.; FISCHER, D. **Partitioning in aqueous two-phase system**. Academic Press, Orlando, 1985.
- 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.
- BEIJERICK, M.W. Zbl. Bakt., v.02, p.627-689, 1896.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
- CAMPBELL, M. K. **Bioquímica**. 3ª ed. Porto Alegre, RS: Editora Artes Médicas Sul, 751p., 2000.
- CASCONE, O.; ANDREWS, B. A.; ASENJO, J. A. Partitioning and Purification of thaumatin in aqueous two-phase system. **Enzyme Microbiology Technology**, v.13, p.629, 1991.
- CHAVES, A. C.; LUCENA-SILVA, N.; ABATH, F. G. C.; PEREIRA, V. R. A.; LIMA-FILHO, J. L.; PORTO, A. L. F.; CABRAL, J. M. S. Liquid-liquid extraction of *Schistosoma mansoni* recombinant protein from an *Escherichia coli* extract in aqueous two-phase systems. **Bioprocess Engineering**, v.22, n.5, p. 435-438, 2000.

- CISNEIROS, M.; BENAVIDES, J.; BRENES, C. H.; RITO-PALOMARES, M. Recovery in aqueous two-phase systems of lutein produced by the green microalga *Chlorella protothecoides*. **Journal of Chromatography B**, v.807, p.105-110, 2004.
- CORTEZ, E. V.; ALMEIDA, M. G. F.; ROBERTO, I. C.; PESSOA JR, A.; VITOLO, M. Liquid-liquid extraction of xylitol dehydrogenase from *Candida guilliermondii* homogenate by reversed micelles. **Journal of Chromatography B**, v.807, p.55-60, 2004.
- COSTA, S. A.; PESSOA JR., A.; ROBERTO, I. C. Xylanase Recovery. Effect of extraction conditions on the aqueous two-phase system using experimental desing. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 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. **Journal of Chromatography B**, v. 743, p. 339-348, 2000.
- DIAMOND, A. D.; HSU, J. T. Aqueous two-phase systems for biomolecule separation. **Advances in Biochemistry Engineering**, v.47, p.89-135, 1992.
- DONELLI, G.; FIORENTINI, C.; MATARRESE, P.; FALZANO, L.; CARDINES, R.; MASTRANTONIO, P.; PAYNE, D. W.; TITBALL, R. W. Evidence for cytoskeletal changes secondary to plasma membrane functional alterations in the *in vitro* cell response to *Clostridium perfringens* epsilon toxin. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Disease**. v.26, p. 145-156, 2003.
- DYR, J. E.; SUTTNAR, J. Separation used for purification of recombinant proteins. **Journal of Chromatography B**, v. 699, p. 383-401, 1997.
- 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. **Journal of Chromatography B**, v. 807, p.139-144, 2004.
- FINNIE, J. W. Neurological disorders produced by *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin. **Anaerobe**, v.10, n. 2, p. 145-150, 2004.
- FINNIE, J. W.; BLUMBERGS, P. C.; MANAVIS, J. Neuronal damage produced in rat brains by *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin. **Journal of Comparative Pathology**, v.120, n.4, p.415-420, 1999.
- FORCINITI, D. **Aqueous two-phase systems: Methods and Protocols**. In: KAUL, R. H. Methods in Biotechnology, Human Press Inc, Totowa, NJ, v.11, 2002.

- FORCINITI, D., HALL, C. K. Influence of polymer molecular weight in temperature on phase composition in ATPS. **Fluid Phase Equilibria**, v.61, p.243-262, 1991.
- GAVASANE, M. R.; GAIKAR, V. G. Aqueous two-phase affinity partitioning of *Penicillin acylase* from *E. coli* in presence of PEG-derivatives. **Enzyme and Microbial Technology**, v.32, p. 665-675, 2003.
- GUAN, Y.; LILLEY, T. H. Theory of phase equilibria for multicomponent aqueous solutions: applications to aqueous polymer two-phase systems. **Journal of Chemical Society Faraday Trans**, v. 89, n. 24, p. 4283-4298, 1993.
- GÜNDÜZ, U.; KORKMAZ, K. Bovine serum albumin partitioning in aqueous two-phase system: Effect of pH and sodium chloride concentration. **Journal of Chromatography B**, v. 743, p.255-258, 2000.
- HATHEWAY, C. L.; WHALEY, D. N.; DOWELL, JR. V. R. Epidemiological aspects of *Clostridium perfringens* in foodborne illness. **Food Technology**, v.34, p.77-90, 1990.
- HUDDLESTON, S.; VEIDE, A.; KÖHLER, K.; FLANAGAN, J.; ENFORS, S. O.; LYDDIAT, A. The molecular basis of partitioning in aqueous two-phase systems. **Trends Biotechnology**, v.9, p. 381, 1991.
- HUNTER, S. E. C.; CLARKE, I. N.; KELLY, D. C.; TITBALL, R. W. Cloning and nucleotide sequencing of the *Clostridium perfringens* epsilon toxin gene and its expression in *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v.60, p.102-110, 1992.
- JOHANSSON, G.; ANDERSON, M.; AKERLUND, H-E. Counter distribution of yeast enzymes with polymer-bound triazine dye affinity ligands. **Journal of Chromatography**, v.289, p.483-493, 1984.
- KAUL, A. **Aqueous two-phase systems: Methods and Protocols**. In: KAUL, R. H. Methods in Biotechnology, Human Press Inc, Totowa, NJ, v.11, 2002.
- KULA, M-R.; KRONER, K. H.; HUSTED, T.H. Purification of enzymes by liquid-liquid extraction. **Advances in Biochemical Engineering**, v.24, p.73-118, 1982.
- LEIGTON, T. J.; DOI, R. H.; WARREN, R. A. J.; KELLN, R. A. **Journal Molecular Biology**, v. 76, p. 103-122, 1973.
- LI, J. Synthesis of polyethyleneglycols (PEGs): Derivatives and applications in biomaterials. **BME**, 430, 2001.
- LI, M.; PEEPLES, T. L. Purification of hyperthermophilic archaeal amylolytic enzyme (MJA1) using thermoseparating aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B**, v.807, p.69-74, 2004.
- 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. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.52, n.4, 2000.
- MARCOS, J. C.; FONSECA, L. P.; RAMALHO, M. T.; CABRAL, J. M. S. Variation of penicillin acylase partition coefficient with phase volume ratio in poly(ethylene glycol)-sodium citrate aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B**, v. 711, p.295-299, 1998.
- MARCOS, J. C.; FONSECA, L. P.; RAMALHO, M. T.; CABRAL, J. M. S. Partial purification of penicillin acylase from *Escherichia coli* in poly(ethylene glycol)-sodium citrate aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B**, v. 734, p.15-22, 1999.
- 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 and Microbial Technology**, 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. **Biochemical Engineering Journal**, v.18, p.217-223, 2004.
- MCDONEL, J. L. *Clostridium perfringens* toxins (type A, B, C, D, E). **Pharmacology Therapy**, v.10, p.617-655, 1980.
- MERCHUK, J. C.; ANDREWS, B. A.; ASENJO, J. A. Aqueous two-phase systems for protein separation . Studies on phase inversion. **Journal of Chromatography B**, v.711, p.285-293, 1998.
- MIYAMOTO, O.; MINAMI, J.; TOYOSHIMA, T.; NAKAMURA, T.; MASADA, T.; NAGAO, S.; NEGI, T.; ITANO, T.; OKABE, A. Neurotoxicity of *Clostridium perfringens* epsilon toxin for the rat hippocampus via the glutamatergic system. **Infection and Immunity**, v.66, n.6, p.2501-2508,1998.
- MIYAMOTO, O.; SUMITANI, K.; NAKAMURA, T.; YAMAGAMI, S-I.; MIYATA, S.; ITANO, T.; NEGI, T.; OKABE, A. *Clostridium perfringens* epsilon toxin causes excessive release of glutamate in mouse hippocampus. **FEMS Microbiology Letters**, v.189, n.1, p.109-113, 2000.
- MIYATA, S.; MATSUSHITA, O.; MINAMI, J.; KATAYAMA, S.; SHIMAMOTO, S.; OKABE, A. Cleavage of a C- terminal peptide is essential for heptamerization of *Clostridium perfringens* ϵ -toxin in the synaptosomal membrane. **Journal Biological Chemistry**, v.276, n.17, p.13778-13783, 2001.
- MOREIRA, K. A.; PORTO, T. S.; TEIXEIRA, M. F. S.; PORTO, A. L. F ; LIMA FILHO, J. L. New alkaline protease from *Nocardiopsis* sp.: partial purification and characterization **Process Biochemistry**, v. 39, n. 1, p. 67-72, 2003.

- MOZZER, O. D. Vallée S. A. (Comunicação pessoal), 2002.
- NAGAHAMA, M.; OCHI, S.; SAKURAI, J. Assembly of *Clostridium perfringens* epsilon toxin on MDCK cell membrane. **Journal of Nature Toxins**, v.7, n.3, p.291-302, 1998.
- NIELSEN, S.; ASENJO, J. A. Partitioning and purification of monoclonal antibodies in ATPS. In: **8th International Conference on Partitioning in ATPS**, n.7, 1991, New Orleans, L.A. Anais... 1991.
- OLIVEIRA, G. G. G.; SILVA, D. P.; ROBERTO, I. C.; VITOLO, M.; PESSOA-JUNIOR, A. Purificação de glicose-6-fosfato desidrogenase em sistemas de duas fases aquosas utilizando PEG/citrato. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v.37, n.2, p.176-187, 2001.
- OLIVEIRA, G. G. G.; SILVA, D. P.; ROBERTO, I. C.; VITOLO, M.; PESSOA-JUNIOR, A. Partition behavior and partial purification of hexokinase in aqueous two-phase polyethylene glycol/citrate systems. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.105-108, p. 787-797, 2003.
- OLIVEIRA, L. A.; SARUBBO, L. A.; PORTO, A. L. F.; LIMA-FILHO, J. L.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; TAMBOURGI, E. B. Physical and rheological characterisation of polyethylene glycol-cashew-nut tree gum aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B**. v. 766, p. 27-36, 2001.
- OLIVEIRA, L. A.; SARUBBO, L. A.; PORTO, A. L. F.; LIMA-FILHO, J. L.; 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 Biochemistry**, v. 38, n.5, p. 693-699, 2002.
- PARREIRAS, P. M. **ELISA competitivo para detecção de imunoglobulina antiprotóxina épsilon produzida pelo *Clostridium perfringens* tipo D**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Universidade Federal de Minas Gerais, 44p., 2001.
- PAYNE, D.; OYSTON, P. The *Clostridium perfringens* ϵ -Toxin. In: **The Clostridia: Molecular Biology and Pathogenesis**. Cap.25, 1997.
- PETIT, L.; GIBERT, M.; POPOFF, M. R. *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. **Trends in Microbiology**, v. 7, n. 3, p. 104-110, 1999.
- PETIT, L.; GIBERT, M.; GILLET, D.; LAURENT-WINTER, C.; BOQUET, P.; POPOFF, M. R. *Clostridium perfringens* epsilon toxin acts on MDCK cells by forming a large membrane complex. **Journal of Bacteriology**, v.79, p.6480-6487, 1997.
- RABELO, A. P. B.; TAMBOURGI, E. B.; PESSOA-JR, A. Bromelain partitioning in two-phase aqueous systems containing PEO-PPO-PEO block copolymers. **Journal of Chromatography B**, v.807, p.61-68, 2004.

- RIBEIRO, M. Z. **Extração de glicose-6-fosfato desidrogenase em sistemas de duas fases aquosas**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica). Universidade de São Paulo, 138p., 2001.
- RITO-PALOMARES, M.; CUETO, I. Effect of biological suspensions on the position of binodal curve in aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B**. v.743, p.5-12, 2000.
- ROOD, J. I.; McCLANE, B. A.; SONGER, J. G.; TITBALL, R. W. **The Clostridia: Molecular Biology and Pathogenesis**, Academic Press, San Diego, 1997.
- SANTOS, M. R. **Purification and characterization of trypsin from intestinal and pyloric caecal tissues of the silk snapper *Lutjanus vivanus* (cuvier, 1828)**. Dissertação (Mestrado em Biologia) – University of Puerto Rico, Porto Rico, 49 p., 2003.
- SARMENTO, M. J.; PIRES, M. J.; CABRAL, J. M. S.; AIRES-BARROS, M. R. Liquid-liquid extraction of a recombinant protein, cytochrome b5, with aqueous two-phase systems of polyethylene glycol and potassium phosphate salts. **Journal of Chromatography A**, v. 668, p.117-120, 1994.
- SARUBBO, L. A. **Caracterização de um novo sistema bifásico aquoso e aplicação em extração de proteínas com coluna de discos perfurados rotativos**. Tese (Doutorado em Engenharia Química)– Universidade de Campinas/UNICAMP, Campinas, 174 p., 2000.
- SCHMIDT, A. S.; VENTON, A. M.; ASENJO, J. A. Partitioning and purification of α -amylase in aqueous two-phase. **Enzyme Microbiology Technology**. v. 16, p. 131-142, 1994.
- SEADER, J. P.; HENLEY, J. E. **Separation process principles**. John Wiley & Sons, New York, p.886,1998.
- SEBASTIÃO, M. J. C. B. **Purificação de lipases utilizando sistema de duas fases aquosas**. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa. 153p., 1996.
- SHORT, S. J.; TITBALL, R. W.; LINDSAY, C. D. An assessment of the in vitro toxicology of *Clostridium perfringens* type D ϵ -toxin in human and animal cells. **Human and Experimental toxicology**, v.19, p.108-116, 2000.
- SOUZA, M. A ; RIBEIRO, M. Z., SILVA, D. P., PESSOA-JR, A; VITOLO, M. Effect of pH on the stability of hexokinase and glucose 6-phosphate dehydrogenase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.98-100, p.265-272, 2002.
- SRINIVAS, N. D.; BARHATE, R. S.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Aqueous two-phase extraction in combination with ultrafiltration for downstream processing of *Ipomoea* peroxidase. **Journal of Food Engineering**, v.54, p. 1-6, 2002.
- TJERNELD, F.; PERSSON, I.; ALBERTSSON, P-A. Enzymatic hydrolysis of cellulose in aqueous two-phase systems. Partition of cellulases from *Trichoderma reesei*. **Biotechnology and Bioengineering**, v.27, p. 1036-1043, 1985.

- TUBIO, G.; NERLI, B.; PICÓ, G. Relationship between the protein surface hydrophobicity and its partitioning behaviour in aqueous two-phase systems of polyethyleneglycol-dextran. **Journal of Chromatography B**, v. 799, p. 293-301, 2004.
- VEIDE, A.; LINDBÄCK, T.; ENFORS, S-O. Continuous extraction of β -D-galactosidase from *Escherichia coli* in an aqueous two-phase system: effects of biomass concentration on partitioning and mass transfer. **Enzyme and Microbial Technology**, v.6, issue 7, p.325-330, 1984.
- VENÂNCIO, A. A. D. **Caracterização de novos sistemas para partição bifásica de biomoléculas**. Tese (Doutorado em Engenharia Biológica), Universidade do Minho, Braga. 154p., 1996.
- VERNAU, J.; KULA, M. R. Extraction of proteins from biological raw material using aqueous polyethylene glycol-citrate phase systems. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v.12, p.379-404, 1990.
- VOET, D., VOET, J. G., PRATT, C. W. **Fundamentos de Bioquímica**. 1ª ed. Porto Alegre, RS: Editora Artes Médicas Sul, 2000. 931p.
- ZASLAVSKY, B. Y. **Aqueous two-phase partitioning: Physical chemistry and bioanalytical applications**. New York : Marcel Dekker, 1995.
- ZAVARZINA, A. G.; DEMIN, V. V.; NIFANT`EVA, T. I.; SHKINEV, V. M.; DANILOVA, T. V.; SPIVAKOV, B. Ya. Extraction of humic acids and their fractions in poly(ethylene glycol)-based aqueous biphasic systems. **Analytica Chimica Acta**, v.452, p. 95-103, 2002.
- Balasubramaniam