



# **INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ**

## **MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

### **UTILIZAÇÃO DE SISTEMAS BIFÁSICOS AQUOSOS PARA PURIFICAÇÃO DE BIOPRODUTOS DE INTERESSE FARMACÊUTICO**

Trabalho submetido por  
**Andreia Filipa Dionísio Colaço**  
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

**Outubro de 2014**





**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
EGAS MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**UTILIZAÇÃO DE SISTEMAS BIFÁSICOS AQUOSOS PARA  
PURIFICAÇÃO DE BIOPRODUTOS DE INTERESSE  
FARMACÊUTICO**

Trabalho submetido por  
**Andreia Filipa Dionísio Colaço**  
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por  
**Professora Doutora Maria Catarina M. Dias de Almeida**

**Outubro de 2014**





## **Agradecimentos**

À Professora Doutora Maria Catarina M. Dias de Almeida por todo o apoio, orientação e disponibilidade durante a execução deste trabalho.

A todos os Professores do Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz que fizeram parte integrante da minha formação, em especial à Professora Doutora Ana Isabel Fernandes que me despertou ainda mais o interesse pela indústria e tecnologia farmacêutica, sendo este o caminho que gostaria de seguir no futuro.

À minha mãe e ao meu Padrasto que sempre me mostraram a importância da persistência e do trabalho para conseguir alcançar os meus objectivos para o futuro e me proporcionaram a possibilidade de frequentar um ensino de excelência nesta Academia.

À minha restante família, um obrigada por todo o apoio e suporte ao longo deste percurso.

Às minhas amigas Anita Martins, Susana Morais, Vanessa Simões e Sara Machado por toda a força que me deram, por me ajudarem a ultrapassar os piores momentos sempre com um grande sorriso, por partilharem todos os bons momentos comigo, pela paciência e apoio que foram essenciais para completar mais uma etapa da minha vida.

Aos meus colegas e amigos de faculdade Filipa Matilde, Luís Rodrigues, Henrique Martins, Inês David, João Carlos Silva, João Rodrigues e Joana Calisto agradeço por todo o nosso percurso académico, por todas as noites passadas em claro a estudar para mais um exame, por todo o apoio que me foi dado ao longo destes 5 anos e a nossa amizade que decerto perdurará por muito tempo.

Obrigada!



## Resumo

Os sistemas bifásicos aquosos formam-se devido à incompatibilidade entre duas soluções aquosas, podendo estas ser formadas por dois polímeros ou por um polímero e um sal. A utilização destes sistemas em processos de separação apresenta inúmeras vantagens em comparação com outros métodos de separação e purificação de biomoléculas, sendo assim utilizados como um dos passos da sequência de etapas de extracção/purificação.

A elevada quantidade de água, a biocompatibilidade, a sua capacidade de reprodução em larga escala, o baixo custo das matérias-primas utilizados e a possibilidade de reutilizar os polímeros e sais são algumas das vantagens que o fazem ser alvo de estudo em inúmeras aplicações, tanto no ramo alimentar, como no ramo da indústria farmacêutica.

Esta dissertação aborda as aplicações onde estes podem ser utilizados no que diz respeito aos produtos de interesse farmacêutico, tais como antibióticos, anticorpos monoclonais, proteínas, entre outros. É feita uma revisão dos métodos já existentes, comparando-os de forma a proporcionar uma perspectiva global do que já foi conquistado pela investigação e pretende-se aferir se esta técnica poderá ser um método viável para a obtenção de biomoléculas em larga escala de forma eficiente, segura, económica e ecológica.

**Palavras-Chave:** Sistema bifásico aquoso; Purificação; Biomoléculas; Indústria farmacêutica



## **Abstract**

The aqueous two-phase systems are formed due to the incompatibility between two aqueous solutions composed two polymers or a polymer and a salt. The separation methods using these systems have several advantages over other methods of separation and purification of biomolecules, therefore they can be used as one of the steps in downstream operation.

The high amount of water, biocompatibility, their ability to be reproducible on large scale, the low cost of raw materials used and the possibility of reusing the polymer and salts are some advantages that are being studied in numerous applications both in, the food industry and in the field of pharmaceutical industry.

This thesis discusses applications where they can be used with respect to products of pharmaceutical interest, such as antibiotics, antibodies, and proteins, among others. A review of existing methods is made, comparing them to provide a global perspective on what has already been achieved by research and assessing whether this technique could be a viable method for obtaining large-scale biomolecules in an efficient, safe, economical and environmentally friendly way.

**Keywords:** Aqueous two-phase system; Purification; Biomolecules; Pharmaceutical industry



## Índice Geral

|                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------|----|
| Índice de Figuras.....                                                           | 11 |
| Índice de Equações .....                                                         | 15 |
| Índice de Tabelas .....                                                          | 17 |
| Lista de Abreviaturas .....                                                      | 19 |
| CAPÍTULO1 - Introdução.....                                                      | 21 |
| CAPÍTULO 2 - Sistemas Bifásicos Aquosos.....                                     | 25 |
| 2.1- Factores que influenciam a partição de biomoléculas no SBA.....             | 30 |
| 2.1.1. pH.....                                                                   | 31 |
| 2.1.2. Peso Molecular do polímero .....                                          | 31 |
| 2.1.3. Temperatura.....                                                          | 32 |
| 2.1.4. Propriedades das biomoléculas .....                                       | 33 |
| CAPÍTULO 3 - Aplicações dos Sistemas Bifásicos Aquosos.....                      | 35 |
| 3.1. Purificação de Proteínas.....                                               | 35 |
| 3.1.1. Enzimas .....                                                             | 36 |
| 3.1.2. Anticorpos .....                                                          | 38 |
| 3.2. Purificação de Antibióticos .....                                           | 42 |
| 3.2.1 Estudos dos factores que influenciam o sistema na ciprofloxacina .....     | 42 |
| 3.2.2. Estudos dos factores que influenciam o sistema no Ácido Clavulânico ..... | 44 |
| 3.3. Purificação de Aminoácidos .....                                            | 46 |
| CAPÍTULO 4- Reciclagem dos Componentes do SBA .....                              | 51 |
| CAPÍTULO 5 – Produção em larga escala com o SBA.....                             | 55 |
| 5.1. Optimização dos SBA.....                                                    | 56 |
| 5.2. Equipamentos .....                                                          | 58 |
| CAPÍTULO 6 - Abordagem Económica e Ecológica do SBA.....                         | 63 |
| CAPÍTULO 7 – Considerações Finais.....                                           | 67 |
| Bibliografia.....                                                                | 69 |



## Índice de Figuras

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1:Esquema geral da purificação de produtos biotecnológicos (Prinz, Koch, Górak, & Zeiner, 2014).....                                                                                                                                                                                                             | 23 |
| Figura 2: Extracção do produto final através do sistema bifásico aquoso (Raja et al., 2012) .....                                                                                                                                                                                                                       | 26 |
| Figura 3: Curva binodal. TBC- curva binodal; C- ponto crítico; TB- “tie-line”; T- composição da fase superior; B- composição da fase inferior; X,Y,Z- composição total do SBA (Raja et al., 2012). ....                                                                                                                 | 28 |
| Figura 4: Factores que influenciam a partição dos SBA (adaptado de (Wang, Han, Xu, Hu, & Yan, 2010)). ....                                                                                                                                                                                                              | 31 |
| Figura 5: Coeficiente de partição (a); Rendimento (b); Pureza (c) para recuperação da IgG no sobrenadante de cultura de células com o sistema UCON/Dextrano, sem ligando (cinzento) e com 15% de ligando (preto) (TE-COOH) (I. F. Ferreira et al., 2008).....                                                           | 39 |
| Figura 6: Esquema representativo do modelo de extracção através de múltiplas fases, adaptado de (Paula A J Rosa et al., 2013). FI- Fase inferior; FS- Fase Superior, TP1 – Fase Superior rica em PEG; TP2 – Fase Superior rica em Sal; BPE – Fase Inferior concentrada (extracção); CS – Sobrenadantes de células. .... | 41 |
| Figura 7: Efeito da concentração de Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> na partição da ciprofloxacina (Mokhtarani, Karimzadeh, Amini, & Manesh, 2008).....                                                                                                                                                                  | 43 |
| Figura 8: Efeito da concentração de PEG na partição de ciprofloxacina (Mokhtarani et al., 2008).....                                                                                                                                                                                                                    | 43 |
| Figura 9: Efeito da temperatura da partição da ciprofloxacina (Mokhtarani et al., 2008). ....                                                                                                                                                                                                                           | 44 |
| Figura 10: Resultados do coeficiente de partição do ácido clavulânico no sistema PEG/NaPA a 25°C. O cinzento-escuro corresponde ao sistema em que se adicionou 6% de Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> e o cinzento claro ao sistema a que se adicionou 1.05% de NaCl (Pereira et al., 2012).....                         | 45 |



|                                                                                                                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 11: Resultados da comparação experimental dos coeficientes de partição da D-alanina e a função da <i>tie-line</i> com diferentes pH's (Salabat et al., 2007). .... | 47 |
| Figura 12: Resultados da comparação experimental dos coeficientes de partição da L-valina e a função da <i>tie-line</i> com diferentes pH's (Salabat et al., 2007). ....  | 47 |
| Figura 13: Resultados da comparação experimental dos coeficientes de partição da L-leucina e a função da <i>tie-line</i> com diferentes pH's (Salabat et al., 2007). .... | 48 |
| Figura 14: Partição através de SBA em uma ou duas etapas, com ultrafiltração (adaptado de (Rito-Palomares, 2004)) .....                                                   | 51 |
| Figura 15: Purificação de CGTase num SBA constituído por EOPO/fosfato e a sua reciclagem por termo-separação, adaptado de (Ng et al., 2012). ....                         | 53 |
| Figura 16: Etapas gerais no PDE, adaptado de (Raja et al., 2012). ....                                                                                                    | 57 |
| Figura 17: A- Misturador-decantador para extracção de biomoléculas; B- Modelo horizontal, C- Modelo vertical(Cunha & Aires-Barros, 2002).....                             | 60 |
| Figura 18: Exemplo de coluna agitada mecanicamente (Cunha & Aires-Barros, 2002). ....                                                                                     | 61 |
| Figura 19: Exemplo de coluna sem agitação, coluna <i>spray</i> (Cunha & Aires-Barros, 2002). ....                                                                         | 61 |
| Figura 20: Equipamento de centrifugação (Cunha & Aires-Barros, 2002).....                                                                                                 | 62 |
| Figura 21: Custos de produção (adaptado de (P. a J. Rosa, Azevedo, Sommerfeld, Bäcker, & Aires-Barros, 2011)).....                                                        | 64 |
| Figura 22: Desenvolvimento de bioprocessos, adaptado de (Heinzle et al., 2006). ....                                                                                      | 65 |



## Índice de Equações

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Equação 1: Equação do coeficiente de partição (K) .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 29 |
| Equação 2: Cálculo do rendimento de extracção da fase superior ( $R_S$ ); $V_S$ - Volume da fase superior; $C_{ES}$ - Concentração de equilíbrio do componente da fase superior; $C_{EI}$ - Concentração de equilíbrio do componente da fase inferior; $V_0$ - Volume inicial da mistura; $V_I$ - Volume da fase inferior; $V_S$ - Volume da fase superior; $R$ - Volume entre a fase inferior e a fase superior; $C_0$ - Concentração inicial da mistura(Raja et al., 2012).. | 29 |
| Equação 3: Cálculo do rendimento de extracção da fase inferior ( $R_I$ ) (Raja et al., 2012). .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 30 |
| Equação 4: (1) – Partição do produto na fase superior; (2) – Partição do produto na fase inferior (Raja & Murty, 2012). .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 30 |
| Equação 5: Equação linear que relaciona a hidrofobicidade das biomoléculas com o seu coeficiente de partição; $P$ -hidrofobicidade da biomolécula em solução; $P_0$ - hidrofobicidade intrínseca do SBA utilizado; $K$ - coeficiente de partição da biomolécula; $R$ - constante universal dos gases perfeitos ( $0.082 \text{ L.atm.K}^{-1}\text{mol}^{-1}$ ) (Raja et al., 2012)..                                                                                           | 33 |
| Equação 6: Equação de Collander: $K_j$ e $K_i$ – coeficientes de partição do soluto; $a_{ij}$ e $b_{ij}$ – constantes dependentes da composição das fases (De Barros et al., 2014). .....                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 49 |



## Índice de Tabelas

Tabela 1: Separação de biomoléculas através de SBA (adaptado de (Raja et al., 2012)).27

Tabela 2: Proteínas que foram purificadas através de SBA (adaptado de (Asenjo & Andrews, 2012))..... 35

Tabela 3: Exemplos de ATPAP para a recuperação e purificação de biomoléculas (adaptado de (Ruiz-Ruiz et al., 2012)). ..... 37

Tabela 4: Resultados do estudo da purificação contínua de anticorpos (Paula A J Rosa et al., 2013) ..... 41

Tabela 5: Grupos de aminoácidos repartidos segundo as características químicas das suas cadeias laterais. .... 49

Tabela 6: índice de massa das matérias-primas utilizadas e os seus respectivos factores ambientais *input* e *output* (adaptado de (P. a J. Rosa et al., 2011))...... 66



## Lista de Abreviaturas

**AC** - Ácido clavulânico

**ATPAP** - Partição por afinidade do Sistema Bifásico Aquoso

**CHO** - células do ovário de hamster

**C<sub>EI</sub>** - Concentração de equilíbrio do componente da fase inferior

**C<sub>ES</sub>** - Concentração de equilíbrio do componente da fase superior

**CS** - células sobrenadantes

**FA** - Factores ambientais

**FFD** - *Full Factorial Design*

**FI** - Fase inferior

**FS** - Fase superior

**IGF-1** - Factor de crescimento

**IgG** - Imunoglobulina G

**NaPA** - Poliacrilato de sódio

**PBD** - *Placket – Burman Design*

**PDE** - Planeamento de ensaios

**PEG** - Polietilenoglicol

**PF** - Planeamento factorial

**PM** - Peso Molecular

**R** - Volume entre a fase inferior e a fase superior

**RE** - Retro-extração

**rhIFN- $\alpha$ 1** - Interferão recombinante humano

**SBA** - Sistema Bifásico Aquoso

**TEG-COOH** - Ácido trietilenoglicol glutâmico

**tPA** - Plasminogénios activadores

**UCON** - óxido de etileno/óxido de propileno

**V<sub>0</sub>** - Volume inicial da mistura

**V<sub>I</sub>** - Volume da fase inferior

**V<sub>S</sub>** - Volume da fase superior



## **CAPÍTULO1 - Introdução**

A biotecnologia é considerada uma área ampla de conhecimento moderno, que conjuga a biologia e a tecnologia, e utiliza sistemas biológicos ou moléculas biológicas, tais como células, organelos celulares, proteínas, entre outros para o desenvolvimento, transformação e extração de produtos de forma a que possam ser aplicados em várias áreas desde a medicina, indústria alimentar, farmacêutica e ambiental (Daan J. A. Crommelin, 2004).

Ao longo do tempo, a investigação da produção de produtos biológicos passou a ter um grande impacto na área da biotecnologia devido à sua utilização para a obtenção de produtos com aplicação terapêutica, como anticorpos monoclonais, proteínas, enzimas, aminoácidos e muitos outros (P. A J Rosa, Azevedo, Sommerfeld, Bäcker, & Aires-Barros, 2011). No entanto, a recuperação de produtos biológicos requer muitas etapas até a consecução do produto final: é necessário remover os contaminantes, isolar o produto alvo e purificá-lo para que possa ser comercializado (Ratanapongleka, 2010).

Os principais obstáculos na produção de bioprodutos em larga escala são os seus custos e o impacto no meio ambiente (Ratanapongleka, 2010), além de ser difícil conseguir uma recuperação e purificação eficiente no que diz respeito aos produtos biofarmacêuticos (P. a J. Rosa, Ferreira, Azevedo, & Aires-Barros, 2010).

Uma das etapas mais importantes do todo o processo é a separação do produto alvo, também conhecida como “processamento a jusante” (Doran, 2003), já que inclui os passos realizados após a produção propriamente dita (por exemplo, por fermentação). Do processamento a jusante constam técnicas como a cromatografia, a electroforese e a extracção líquido-líquido (Ratanapongleka, 2010).

A cromatografia e a extracção líquido-líquido são, normalmente, as técnicas mais utilizadas na separação de produtos de origem biológica. A primeira é, habitualmente, preferida nos processos de purificação (Fig.1). Contudo apresenta várias desvantagens ao longo do processo (P. A J Rosa et al., 2011) e, para ser utilizada na produção em larga escala, o custo é muito elevado (Molino, Viana Marques, Júnior, Mazzola, & Gatti, 2013). A extracção líquido-líquido apresenta algumas vantagens

como uma melhor selectividade e uma boa combinação entre os passos de recuperação e purificação, custos mais baixos, bom rendimento e uma purificação melhorada, comparando com a cromatografia. No entanto, também se observam algumas limitações, pois este método utiliza compostos orgânicos voláteis, que proporcionam imiscibilidade com meios aquosos, e lhes conferem alta toxicidade e baixa biocompatibilidade contribuindo para a degradação das biomoléculas em recuperação (Passos et al., 2013).

Na extracção de produtos, principalmente nos de interesse farmacêutico, é muito importante ter uma boa recuperação e purificação. O processo de purificação deve ser facilmente implementável e capaz de remover impurezas relacionadas com o produto de forma a garantir a sua segurança e grau de pureza, o que implica custos elevados. Não menos importantes para o processo são a rapidez do desenvolvimento do processo e o seu rendimento (P. a J. Rosa et al., 2010).

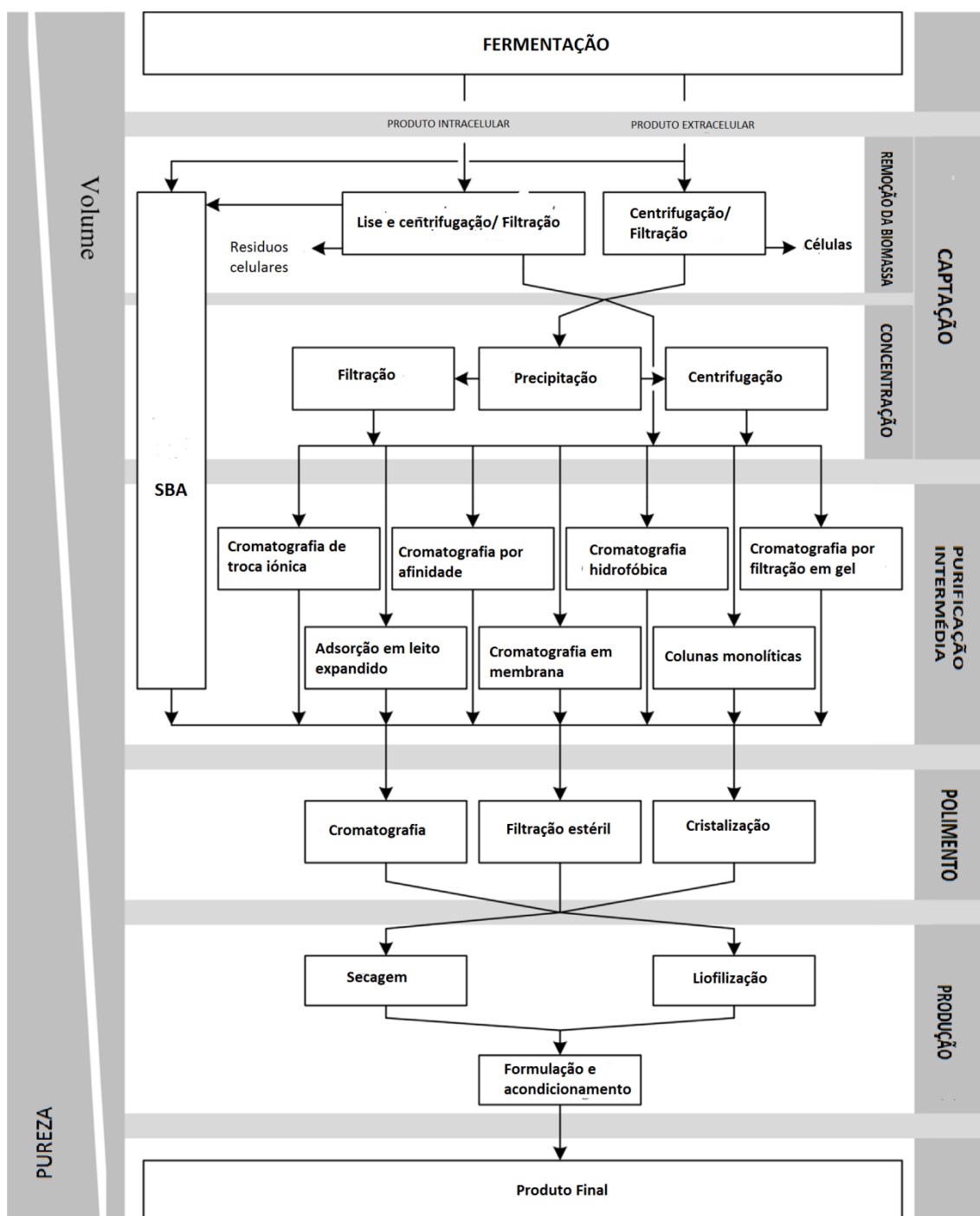


Figura 1: Esquema geral da purificação de produtos biotecnológicos (Prinz, Koch, Górak, & Zeiner, 2014).

Estes processos representam 80% dos custos totais dos bioprocessos, e como tal a biotecnologia tem desenvolvido estratégias de otimização de forma a torná-los rentáveis e eficientes (Ruiz-Ruiz, Benavides, Aguilar, & Rito-Palomares, 2012).

Em 1958, Albertsson introduziu o conceito de sistema bifásico aquoso (SBA) que tinha como objectivo a separação de biomoléculas através da sua migração preferencial para uma das fases líquidas aquosas (Passos et al., 2013). Este baseou-se no trabalho de Beijerinck, que analisou soluções aquosas de gelatina e agar, a uma determinada concentração e temperatura, e concluiu que a mistura destas soluções formava duas fases distintas (Albertsson, 1970).

Os métodos convencionais são adequados para a separação de produtos biológicos mas apresentam algumas limitações, por isso os SBA são, maioritariamente, utilizados em aplicações de separação de macromoléculas e na sua purificação (Ruiz-Ruiz et al., 2012). Este sistema apresenta inúmeras vantagens em relação aos abordados anteriormente, pois consegue conciliar a biocompatibilidade com uma fácil produção em larga escala a um custo inferior e com menos desperdícios (P. a J. Rosa et al., 2010).

A elaboração desta monografia tem como principal objectivo rever as aplicações dos SBA na purificação de bioprodutos de interesse farmacêutico publicadas até ao momento em bibliografia científica, comparando esta técnica aos métodos já existentes e abordar as perspectivas futuras para a sua utilização.

Para o efeito, procedeu-se a pesquisa em bases de dados electrónicas, como o “PubMed”, “B-on” e “ScienceDirect”, com as palavras-chave em inglês, tais como “aqueous two-phase system”, “purification”, “biopharmaceuticals” de forma individual e cruzada, com o objectivo de obter resultados mais específicos.

## **CAPÍTULO 2 - Sistemas Bifásicos Aquosos**

A primeira abordagem aos sistemas bifásicos aquosos (SBA) foi feita, por volta de 1950, por Albertsson e desde então foram exaustivamente estudados com o objectivo de extrair e purificar diferentes bioprodutos (Negrete, Ling, & Lyddiatt, 2007) de uma forma mais económica.

Os SBA têm sido utilizados de forma alargada e com sucesso na extração e purificação de biomoléculas, tais como proteínas (Lin, Wang, Zeng, Ding, & Chen, 2013), aminoácidos (De Barros et al., 2014) e de produtos farmacêuticos, como antibióticos (Pereira, Santos, Johansson, Teixeira, & Pessoa Jr., 2012), soros e vacinas (Braas, Walker, & Lyddiatt, 2000).

Estes sistemas formam-se aquando a mistura de dois ou mais polímeros, solúveis em água, ou de um polímero e um sal específico numa solução aquosa, que se encontra acima de uma determinada concentração crítica, tendo como resultado final a formação de duas fases (Fig.2) (L. A. Ferreira, Parpot, Teixeira, Mikheeva, & Zaslavsky, 2012). Para uma determinada composição, definida em massa/massa% (m/m), uma das fases será rica em polímero e outra rica em sal, sendo que em ambas as fases predomina a água (Raja, Murty, Thivaharan, Rajasekar, & Ramesh, 2012).

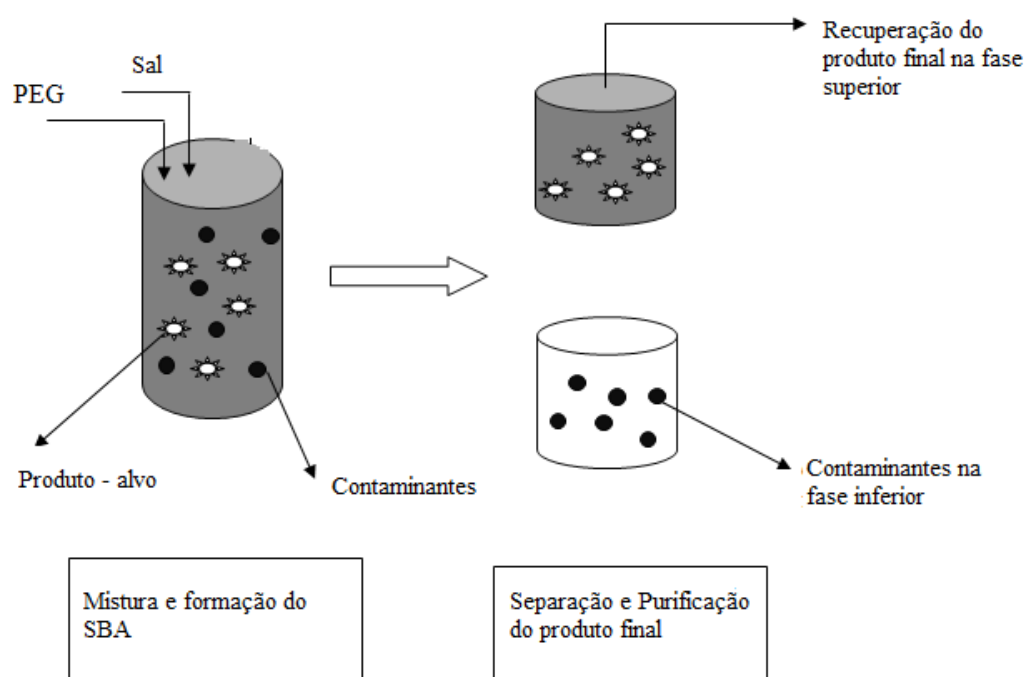


Figura 2: Extração do produto final através do sistema bifásico aquoso (Raja et al., 2012)

O facto de serem constituídos predominantemente por água concede aos SBA facilidade na partição de bioprodutos sem afectar a suas características químicas e biológicas e ainda um estatuto ecológico (Negrete et al., 2007).

Os polímeros mais utilizados nos SBA são o PEG e o dextrano. No entanto, entre estes o PEG é o mais utilizado pois é de baixo custo, tem facilidade em formar fases heterogéneas com outros polímeros ou com sais, tem ainda a vantagem de conseguir recuperar a actividade das proteínas, pois faz com que estas voltem a assumir a sua estrutura funcional, é biocompatível, tem uma baixa tensão superficial e é biodegradável (Raja et al., 2012).

O sistema polímero-sal é mais vantajoso em comparação com o sistema PEG/dextrano, pois é mais económico, menos viscoso, selectivo, baixa tensão interfacial, permite uma rápida separação de fases e ainda uma produção em larga escala mais eficiente, sendo por isso utilizado na purificação e recuperação de enzimas (Albertsson, 1970). Os fosfatos e sulfatos são os sais mais utilizados neste tipo de processo. Os sulfatos são preferencialmente escolhidos, pois promovem interacções

hidrofóbicas entre as fases (Martins et al., 2010), mas apresentam algumas desvantagens se utilizados em grandes concentrações. A fase PEG-Sal só se consegue formar com ligações iónicas fortes, podendo desencadear a desnaturação das estruturas biológicas e a dissociação das ligações proteína-complexo (Venâncio, Almeida, Domingues, & Teixeira, 1995).

Devido a todos estes factores o tipo de SBA a empregar vai depender das propriedades das substâncias que se pretendem manusear e das necessidades do processo. Apresentam-se alguns exemplos na Tabela.1. É importante definir estratégias para o desenvolvimento dos processos de SBA para conhecer o mecanismo de partição do seu soluto, quando se faz produção em larga escala. Uma das estratégias para a selecção do desenvolvimento do SBA pode ser compreendida em quatro fases, segundo Benavides e Rito-Palomares: ter em conta as características químicas e físicas da matéria-prima, seleccionar o tipo de SBA, seleccionar os parâmetros do sistema e avaliar a influência dos parâmetros do processo sobre o produto (P. a J. Rosa et al., 2010).

Tabela 1: Separação de biomoléculas através de SBA (adaptado de (Raja et al., 2012).

| <b>Biomolécula</b> | <b>Sistema Bifásico Aquoso</b> | <b>Referência</b>           |
|--------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| IgG humana         | Dextrano/PEG                   | (Ruiz-Ruiz et al., 2012)    |
| Tripsina           | Dextrano/PEG                   | (Ruiz-Ruiz et al., 2012)    |
| Ácido clavulânico  | PEG/ Fosfato                   | (Raja et al., 2012)         |
| Glucoamilase       | PEG/Fosfato                    | (Ruiz-Ruiz et al., 2012)    |
| $\alpha$ – amilase | PEG/Citrato                    | (Raja et al., 2012)         |
| HBsAg              | PEG/Sulfato                    | (P. a J. Rosa et al., 2010) |

A formação das fases durante o processo de mistura de soluções aquosas é dependente das acções intermoleculares entre os constituintes que formam o sistema e dependem do estado termodinâmico do sistema, ou seja, da temperatura, composição e pressão (L. H. M. da Silva & Loh, 2006). Estas interações são representadas através de um diagrama de fases, que nos dá informações sobre a concentração dos componentes para que se consigam formar duas fases distintas, a concentração dos componentes das fases de superior e inferior e volumes de cada uma das fases (Raja et al., 2012). Todos

estes pontos estão relacionados com a variação da energia livre de Gibbs do sistema e são cruciais para a compreensão dos factores que conduzem à partição de um determinado soluto nos SBA (Raja et al., 2012).

A curva binodal (fig.3) divide as concentrações dos componentes em regiões distintas, as que formam duas fases aquosas imiscíveis (acima da curva) e as que formam apenas uma fase (abaixo da curva) (Raja et al., 2012). Também, aqui, são representadas as linhas de equilíbrio (“tie-lines”) cujos pontos representam a composição das duas fases em equilíbrio (Benavides & Monterrey, 2011).

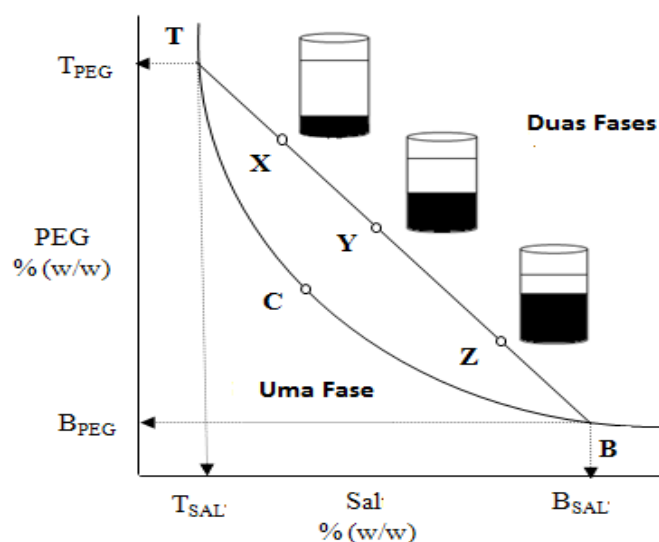


Figura 3: Curva binodal. TBC- curva binodal; C- ponto crítico; TB- “tie-line”; T- composição da fase superior; B- composição da fase inferior; X,Y,Z- composição total do SBA (Raja et al., 2012).

Este tipo de representação gráfica é considerado de extrema importância na realização de estudos de partição (Asenjo & Andrews, 2012) e pode ser feito através de um ensaio de titulação turbidimétrica ou através de uma análise da composição de fases. Qualquer um dos dois métodos, sendo ou não adequados para automação, requer um grande esforço analítico e exige muito tempo para a sua análise e execução, por isso são utilizados marcadores hidrofóbicos como adjuvante para um método mais rápido e automatizável (Bensch, Selbach, & Hubbuch, 2007).

O ponto crítico (C) é formado quando as duas fases, teoricamente, apresentam uma composição idêntica e um coeficiente de partição igual a 1 (Asenjo & Andrews, 2012).

A razão entre a concentração na fase superior (CT) e a concentração da fase inferior (CB) em equilíbrio é definida como coeficiente de partição (K) (Equação.1) (L. A. Ferreira et al., 2012).

$$K = \frac{C_T}{C_B}$$

Equação 1: Equação do coeficiente de partição (K)

O coeficiente de partição de um bioproducto depende de vários factores, que podem ser explorados individualmente ou em conjunto, para perceber qual o comportamento do sistema (Asenjo & Andrews, 2012).

O rendimento de extracção e o factor de purificação são factores de grande importância no que diz respeito à avaliação da eficácia do SBA. O rendimento da fase superior ( $R_S$ ) pode ser calculado fazendo uma relação entre o volume das duas fases (R) e o coeficiente de partição (K) do produto-alvo:

$$R_S = \frac{V_S C_{ES}}{V_0 C_0} = \frac{V_S C_{ES}}{V_S C_{ES} + V_I C_{EI}} = \frac{1}{1 + \frac{1}{\left[\frac{1}{KR}\right]}}$$

Equação 2: Cálculo do rendimento de extracção da fase superior ( $R_S$ );  $V_S$ - Volume da fase superior;  $C_{ES}$ - Concentração de equilíbrio do componente da fase superior;  $C_{EI}$ - Concentração de equilíbrio do componente da fase inferior;  $V_0$ - Volume inicial da mistura;  $V_I$ - Volume da fase inferior; R- Volume entre a fase inferior e a fase superior;  $C_0$ - Concentração inicial da mistura(Raja et al., 2012).

O rendimento de extracção da fase inferior é calculado de forma semelhante, a partir da equação descrita a baixo:

$$R_I = \frac{1}{1 + KR}$$

Equação 3: Cálculo do rendimento de extracção da fase inferior ( $R_I$ ) (Raja et al., 2012).

O factor de purificação é outro dos parâmetros calculados para caracterizar o SBA. Este é definido pela relação entre a concentração do produto na fase selectiva e a concentração inicial do produto:

$$(1) \delta_{C;S} = \frac{C_{AS}}{C_{A0}}$$

$$(2) \delta_{C;I} = \frac{C_{AI}}{C_{A0}}$$

Equação 4: (1) – Factor de purificação na fase superior; (2) – Factor de purificação na fase inferior (Raja & Murty, 2012).

## **2.1- Factores que influenciam a partição de biomoléculas no SBA**

As características químicas e físicas do bioproduto são uma grande influência para o coeficiente de partição do sistema. A hidrofobicidade, a concentração e tipo de polímero e sal, a temperatura, o pH, o peso molecular e a bioafinidade são algumas das características que podem afectar a sua partição (Asenjo & Andrews, 2012).

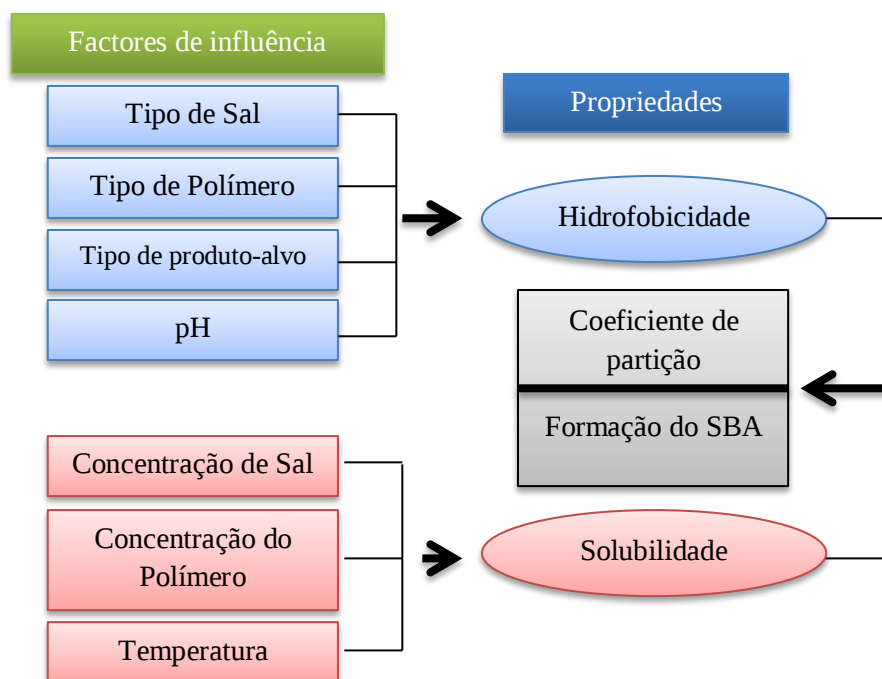


Figura 4: Factores que influenciam a partição dos SBA (adaptado de (Wang, Han, Xu, Hu, & Yan, 2010)).

### 2.1.1. pH

O pH pode alterar a carga do soluto ou a razão entre as moléculas carregadas, assim como afectar a composição das fases tendo como consequência a alteração do coeficiente de partição do sistema (Asenjo & Andrews, 2012).

### 2.1.2. Peso Molecular do polímero

O peso molecular dos polímeros influencia a partição da biomolécula pois altera o número de interações entre o polímero e a biomolécula e a altera o diagrama de fases. O facto de aumentar o peso molecular na fase onde se encontra o polímero proporciona uma distribuição mais forte da biomolécula e aumenta as forças repulsivas entre os dois (Ratanapongleka, 2010).

Quanto maior o peso molecular do polímero, menor a concentração deste necessária para a separação. Uma concentração muito elevada pode levar a várias modificações entre as fases como diferentes densidades, índices refrativos e viscosidade diferente.

No sistema mais utilizado (PEG/Sal), a partição de biomoléculas é baseada no efeito da exclusão do volume, na fase rica em polímero, e por cristalização na fase que contém o sal. Se a fase que contém o sal apresentar uma concentração mais alta, as ligações iônicas aumentam na fase inferior, o que vai melhorar a partição da biomolécula na fase superior. No entanto, se a concentração de PEG for mais alta, maior o número de moléculas envolvidas na partição das biomoléculas, o que vai favorecer a partição das mesmas para a fase superior devido à existência de interações hidrofóbicas entre o polímero e a biomolécula (Raja et al., 2012).

### **2.1.3. Temperatura**

O efeito da temperatura no sistema vai depender do tipo de polímero utilizado. O aumento da temperatura provoca alterações na composição das fases do sistema, aumentando a concentração de PEG e sal nas fases respectivas. Este aumento faz com que haja uma diminuição das moléculas de água, contribuindo para a redução da solubilidade da biomolécula, e destrói a ligação destas tornando a sua estrutura mais flexível (Ratanapongleka, 2010).

O efeito da temperatura pode variar de fase para fase, Reschke e a sua equipa verificaram que o aumento da temperatura vai aumentar a solubilidade do sal da fase rica em PEG, diminuindo a relação equilíbrio-concentração do sal na fase inferior (Reschke, Brandenbusch, & Sadowski, 2014).

Todos os sistemas têm respostas diferentes, por exemplo, um sistema com pequenas concentrações de PEG e sal necessita de temperaturas mais altas para formar as duas fases, no entanto um sistema constituído com PEG e dextrano não necessita de temperaturas tão altas (Ratanapongleka, 2010).

A alteração da temperatura, de uma forma geral, faz com que haja alterações nas propriedades físicas do sistema, tais como a viscosidade e a densidade, e altera a

partição do soluto entre as duas fases. Quando estamos perante temperaturas baixas, a viscosidade aumenta e por consequência a dificuldade de manuseamento e separação de fases também aumenta. No entanto, se a temperatura se encontra muito elevada pode provocar a desnaturação da biomolécula (Bensch et al., 2007).

#### 2.1.4. Propriedades das biomoléculas

A escolha do tipo de sistema a utilizar deve ser feita com base nas propriedades físico-químicas das biomolécula, pois factores como a sua forma, peso e ligações específicas podem afectar a sua partição (Ratanapongleka, 2010).

É conhecida uma relação linear entre a hidrofobicidade da biomolécula e o coeficiente de partição através da seguinte fórmula:

$$\log K = R \log \left( \frac{P}{P_0} \right)$$

Equação 5: Equação linear que relaciona a hidrofobicidade das biomoléculas com o seu coeficiente de partição;  $P$  -hidrofobicidade da biomolécula em solução;  $P_0$ - hidrofobicidade intrínseca do SBA utilizado;  $K$ - coeficiente de partição da biomolécula;  $R$ - constante universal dos gases perfeitos ( $0.082 \text{ L.atm.K}^{-1}\text{mol}^{-1}$ ) (Raja et al., 2012).

Esta relaciona a relação entre a hidrofobicidade da biomolécula que se encontra em contacto com a solução e a hidrofobicidade intrínseca do sistema, pois a carga presente na superfície da biomolécula tem o principal papel na acção do coeficiente de partição. As cargas levam a diferentes valores de coeficiente de partição na interface das duas fases, o que se traduz em diferentes afinidades para com o sal utilizado (Raja et al., 2012).



## CAPÍTULO 3 - Aplicações dos Sistemas Bifásicos Aquosos

A extração com SBAs tem revelado uma técnica de sucesso na recuperação de biomoléculas. É uma técnica que se integra no processo de extração e purificação, contribuindo para um processo mais eficiente, rápido e ecológico.

Na área farmacêutica este tem tido especial interesse para o desenvolvimento de anticorpos monoclonais, factores de crescimento e hormonas, contribuindo para uma produção em maior quantidade e menos dispendiosa, pois a extração que utiliza as técnicas mais comuns inclui procedimentos morosos e de elevado custo (Paula A J Rosa et al., 2013).

### 3.1. Purificação de Proteínas

A pesquisa no que diz respeito às aplicações de SBA para a extração e purificação de produtos de interesse farmacêutico têm aumentado cada vez mais, assim como o interesse destes aplicados a proteínas. Existem aplicações médicas que necessitam de proteínas em maior quantidade e os métodos convencionais não bastam para garantir a quantidade necessária, por isso é necessário o investimento na investigação para uma produção mais competitiva. Verificou-se, então, que a utilização de processos contínuos com SBA é uma boa alternativa para ultrapassar esse obstáculo (Asenjo & Andrews, 2012).

Tabela 2: Proteínas que foram purificadas através de SBA (adaptado de (Asenjo & Andrews, 2012)).

- 
- **$\alpha$ -Amilase**
  - **IGF-1**
  - **$\alpha$ -Antitripsina Humana (AAT)**
  - **Plasminogénio Activado (tPA)**
  - **Anticorpos Monoclonais (IgG)**
- 

Asenjo (2012) de forma a conseguir uma produção em alta escala e uma produção mais competitiva estudou a possibilidade de utilizar processos contínuos. Para

tal utilizou um sistema constituído por PEG/sal e adicionou-lhe uma concentração considerável de NaCl, verificando que nestas condições a proteína a estudar se deslocaria mais rapidamente para a parte mais hidrofóbica do sistema, a fase constituída por PEG.

Mais tarde observou-se que se aplicasse o mesmo sistema e a mesma quantidade de NaCl a uma proteína de natureza hidrofóbica, como a  $\alpha$ -amilase, esta se deslocava de forma acentuada no sentido da fase rica em PEG, aumentando o coeficiente de partição.

Ao longo dos anos foram feitos inúmeros estudos com proteínas hidrofóbicas, como o interferão  $\alpha$ -1, tecidos de plasminogénios activados (tPA) e anticorpos monoclonais (Asenjo & Andrews, 2012).

### **3.1.1. Enzimas**

Hart e os seus colaboradores (1994) investigaram a separação e purificação do factor de crescimento (IGF-1) com um SBA formado por PEG 8000/sal num caldo de fermentação contendo células de *Escherichia coli*. Este projecto consiste na realização de um isolamento *in situ* da proteína a partir das células permeabilizadas de *E.coli*. Após a fase de fermentação do IGF-1, as células são permeabilizadas com ureia, um forte agente desnaturante, favorecendo assim a permeabilização das paredes *E.coli* e a extracção do IGF-1 na sua forma desnaturada para o sobrenadante. Seguidamente, é adicionado o polímero para a formação do SBA, onde vai ocorrer a partição da proteína que se desloca preferencialmente para a fase superior, de natureza hidrofóbica, dando origem a uma recuperação de 70% e a 96% de produto puro. Foi também conseguida uma produção desta proteína à escala de 1000 L.

Outra proteína hidrofóbica que foi separada através de SBA foi o tPA. Este foi realizado a partir de uma cultura de células de ovário de hamsters (CHO) e um SBA de PEG/dextrano. Tal como as proteínas mencionadas nos casos a cima, esta proteína também migra rapidamente para a fase rica em PEG e atinge valores de K muito altos (100-1000), obtendo-se uma recuperação de 80-100% e uma purificação de 90% (Asenjo & Andrews, 2012).

Ruiz-Ruiz, Benavides, Aguilar e Rito-Palomares (2012) investigaram estratégias que envolviam a modificação da actividade dos ligandos do SBA e verificaram que o rendimento e a purificação dos produtos biológicos aumentavam significativamente. O SBA tem provado que é eficaz na recuperação de bioprodutos, no entanto ainda apresenta falta de especificidade e por isso desenvolveu-se um método que modifica a formação de pelo menos uma fase do sistema através da junção de um ligando com especificidade pela molécula pretendida (ATPAP). No caso das enzimas, utilizou-se a penicilina acilase, pois a sua recuperação através da cromatografia era muito reduzida e por isso a utilização do ATPAP poderia trazer inúmeras vantagens ao seu processo, tais como uma produção mais simples, em maior número e com uma potencial intensificação do processo. Esta técnica pode fornecer resultado similares quando comparada com a cromatografia de com iões metálicos imobilizados (Tabela.3) mas fá-lo de forma mais ecológica e com matérias-primas novas para a formação das diferentes fases (Ruiz-Ruiz et al., 2012).

Tabela 3: Exemplos de ATPAP para a recuperação e purificação de biomoléculas (adaptado de (Ruiz-Ruiz et al., 2012).

| Produto                       | SBA                       | Modificação                 | K                                                                       |
|-------------------------------|---------------------------|-----------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| <b>B-galactosidase</b>        | Dextrano<br>T500/PEG 8000 | Dextrano/Benzoílo           | Diminui de: 0.036 a 0.018                                               |
| <b>Lisozima</b>               | Dextrano<br>T500/PEG 8000 | Dextrano/Benzoílo           | Aumenta de: 0.20 a 0.85                                                 |
| <b>Tripsina</b>               | Dextrano<br>T500/PEG 8000 | PEG/inibidor da<br>tripsina | Aumenta de: 0.5 a 16                                                    |
| <b>Penicilina<br/>acilase</b> | PEG 4000/<br>Fosfato      | PEG/ Benzoato               | Aumenta de: 0.1 a 1.4 com<br>recuperação de 60% numa única<br>extracção |
| <b>Glucoamilase</b>           | PEG 300/ Fosfato          | Amido como<br>ligando livre | Diminui de: 6.6 a 0.73                                                  |

### **3.1.2. Anticorpos**

A utilização de anticorpos em tratamentos médicos e aplicações laboratoriais é cada vez mais relevantes, tendo um importante impacto no combate contra inúmeras doenças como o tratamento de alguns tipos de cancro, doenças autoimunes e neurológicas. Como tal, tem sido alvo de inúmeros estudos para que se consiga uma produção mais eficiente quer no número como no seu custo efectivo e na sua pureza (D. F. C. Silva et al., 2012).

#### **3.1.2.1 Purificação de Imunoglobulina G a partir de sobrenadantes de culturas de células CHO**

A purificação da imunoglobulina Humana G (IgG) foi a primeira investigação feita com o objectivo de isolar um anticorpo. No ano de 2008, foi realizado um estudo de extracção de IgG a partir de sobrenadantes de cultura de células ovário de hamster (CHO) utilizando o SBA e um ligando. Este sistema era composto por óxido de etileno/óxido de propileno (UCON) e dextrano. Neste tipo de sistema, as IgG sofrem a sua partição para a fase menos hidrofóbica, mas devido à adição do ligando, ácido trietilenoglicol glutâmico (TEG-COOH), a IgG desloca-se para a fase superior, o que vai contribuir para que haja um melhor rendimento e um grau de pureza superior (Fig.5). Esta mudança favorece as interacções electroestáticas com os anticorpos, proporcionando um rendimento de 85% e uma pureza de 88% (I. F. Ferreira, Azevedo, Rosa, & Aires-Barros, 2008).

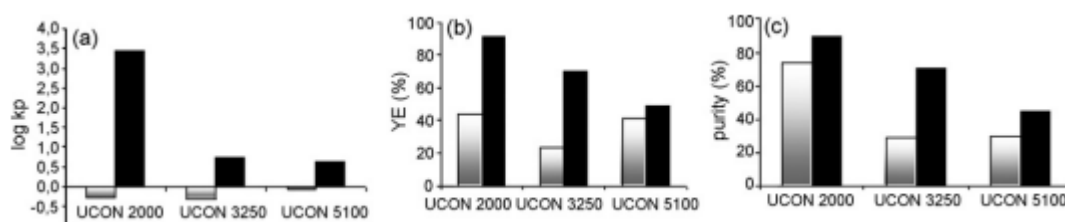


Figura 5: Coeficiente de partição (a); Rendimento (b); Pureza (c) para recuperação da IgG no sobrenadante de cultura de células com o sistema UCON/Dextrano, sem ligando (cinzento) e com 15% de ligando (preto) (TE-COOH) (I. F. Ferreira et al., 2008).

Rosa, Azevedo, Sommerfeld, Mutter, Aires- Barros, Bäcker, em 2009, fizeram a primeira comparação entre a eficiência de um SBA de fase única e um de múltiplas etapas na extracção da IgG, a partir de células de CHO. Foi utilizado um sistema constituído por PEG 3350/fosfato e foram avaliadas as seguintes condições: pH, ligações iónicas, relação entre o volume e a concentração inicial de anticorpos e a concentração de NaCl presente.

No estudo relativo à etapa única concluiu-se que as condições ideais para a extracção da IgG seriam valores baixos de pH, uma elevada concentração de NaCl e uma elevada relação entre os volumes dos componentes. A concentração elevada de NaCl leva a um aumento do K do anticorpo, tal como foi reportado por Andrews *et al.*, em 1996. Este observou que se adicionasse NaCl como polímero na fase rica em sal ocorria uma deslocação do anticorpo da fase rica em sal para a fase rica em PEG, pois faria aumentar a diferença de carácter hidrofóbico entre as fases. Assim, observou-se que a percentagem de contaminantes removidos não depende do valor de pH nem da concentração de NaCl, mas sim da diminuição da relação entre os volumes das duas fases.

No sistema com etapas múltiplas realizou-se um sistema contra-corrente, que compara duas concentrações diferentes de NaCl a um pH definido (pH=6). A relação entre os volumes é a mesma que foi utilizada no sistema de etapa única, de forma a maximizar a quantidade de contaminantes removidos. Com estas condições e um sistema constituído por PEG/fosfato e 10% (p/p) de NaCl foi possível alcançar um rendimento de 89% e uma pureza de 75%, enquanto que no sistema de etapa única, com as mesmas condições, apenas de conseguiu um rendimento de 61% e uma pureza de

55%. Este estudo representa melhorias significativas no que diz respeito à pureza e ao rendimento de extracção (P. A J Rosa et al., 2009).

Em 2012, a purificação da IgG foi estudada a partir da sua aplicação ao sobrenadante de cultura de células de CHO e de células PER.C6 (CS). Foi feito através de um sistema contínuo de SBA que incorpora três passos diferentes: uma extracção, retro-extracção e lavagem (Paula A J Rosa et al., 2013).

Esta técnica foi estudada por vários investigadores, e observou-se um aperfeiçoamento no seu rendimento e purificação em comparação com uma extracção de etapa única. O objectivo é estudar diferentes estratégias para a remoção de impurezas de baixos e altos pesos moleculares das células de forma individual e depois modificá-las para que forme um processo com múltiplas etapas (Paula A J Rosa et al., 2013). Para tal as duas fases, inferior e superior, foram preparadas separadamente, posteriormente sobrepostas e misturadas. A fase inferior é constituída por 14.6% p/p de fosfato a pH 6, 0,01% p/p de PEG, 10,6% p/p de NaCl e 25% p/p de sobrenadante de células (CS) e a fase superior por 29.1% p/p de PEG, 2,7% p/p de fosfato a pH6 e 8,5% de NaCl. O sistema é incubado à temperatura ambiente, até que as fases se encontrem completamente separadas e só depois são medidos os volumes de cada fase e são retiradas, amostras de cada uma das fases para análise da sua composição (Paula A J Rosa et al., 2013).

A extração feita através de múltiplas etapas também utiliza fases preparadas individualmente, tal como o processo descrito anteriormente. No entanto, a recolha das amostras é feita no final de cada etapa de extração.

No processo da retro-extração (RE), a segunda fase da extração, o IgG extraído da fase rica em PEG é introduzido num novo sistema, mas na fase rica em sal utilizando concentrações diferentes de fosfato, pH e massa molecular. As fases são misturadas novamente, espera-se pela sua completa separação e recolhem-se amostras, tal como na primeira extracção. Por último, faz-se a lavagem da IgG presente na fase do sal com PEG 3350.

A imagem abaixo representa todos os passos reproduzidos na extracção e os movimentos das fases em cada passo:

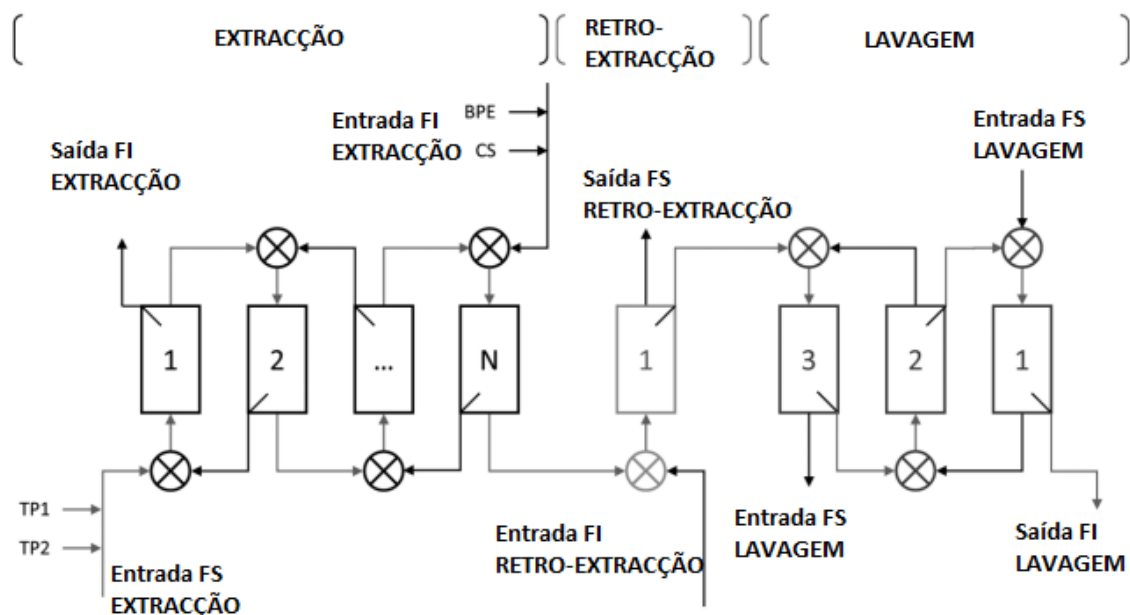


Figura 6: Esquema representativo do modelo de extracção através de múltiplas fases, adaptado de (Paula A J Rosa et al., 2013). FI- Fase inferior; FS- Fase Superior, TP1 – Fase Superior rica em PEG; TP2 – Fase Superior rica em Sal; BPE – Fase Inferior concentrada (extracção); CS – Sobrenadantes de células.

A maior parte das impurezas das células são removidas na primeira etapa, a extracção, no entanto as impurezas que apresentam baixo peso molecular só são removidas nos dois passos subsequentes.

A purificação de IgG a partir de células de CHO e de PER.C6 apresenta resultados de rendimento e pureza finais bastante elevados (ver Tabela.4):

Tabela 4: Resultados do estudo da purificação contínua de anticorpos (Paula A J Rosa et al., 2013) .

|                         | CHO | PER.C6 |
|-------------------------|-----|--------|
| <b>Rendimento (%)</b>   | 80% | 100%   |
| <b>Pureza Final (%)</b> | 97% | 97%    |

Este método mostra a possibilidade de recuperar e purificar anticorpos provenientes de diferentes sobrenadantes de culturas de células, conseguindo superar alterações nas propriedades do sistema devido à presença de impurezas. Os resultados são, por isso, promissores para a aplicação do SBA como plataforma para a recolha de anticorpos (Paula A J Rosa et al., 2013).

### **3.2. Purificação de Antibióticos**

Grande parte dos antibióticos são obtidos através de microorganismos, como fungos e bactérias, mas também pode ter origem vegetal. Os antibióticos estão incluídos no grupo de produtos farmacêuticos com maior impacto terapêutico, actuando contra agentes infecciosos e são fundamentais no tratamento concomitante de neoplasias e após transplantes (Guimarães et al., 2006).

#### **3.2.1 Estudos dos factores que influenciam o sistema na ciprofloxacina**

Em 2008, Mokhtarani e os seus colaboradores estudaram os factores que poderiam afectar o sistema e a partição da ciprofloxacina, e quais as alterações que podem ocorrer. Este estudo foi feito num SBA de PEG/sulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) e foram analisados as acções dos seguintes factores: temperatura, concentração do sal, concentração e massa molecular do polímero.

A ciprofloxacina é um antibiótico de largo espectro que pertence à família das fluoroquinolonas e que é utilizada para o tratamento de certas infecções causadas por bactérias, como infecções urinárias, respiratórias e dermatológicas.

Os resultados demonstraram que a concentração do sal é o factor mais importante na recuperação de um antibiótico. Para mais altas concentrações de sal o coeficiente de partição reduz-se significativamente, uma vez que aumentam as forças das ligações iónicas presentes no sistema e, por consequência, aumenta a tendência para a ciprofloxacina se deslocar para a fase rica em sal, ou seja, para a fase inferior (Fig.7).

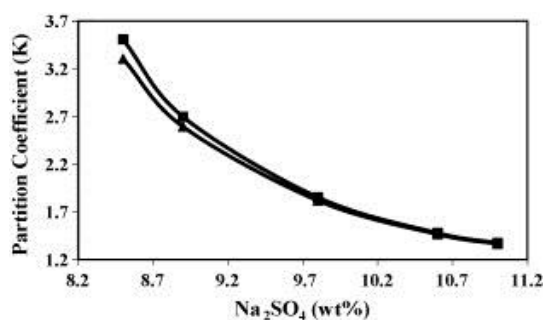


Figura 7: Efeito da concentração de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> na partição da ciprofloxacina (Mokhtarani, Karimzadeh, Amini, & Manesh, 2008).

Relativamente à concentração de PEG no sistema, verificou-se um comportamento irregular. A baixas concentrações (aproximadamente 12 a 20 %), o coeficiente de partição do antibiótico diminui e o efeito oposto é observado em altas concentrações de polímero (a partir de aproximadamente 20 %) (Fig.8.) Estima-se que este efeito pode estar relacionado com a interacção entre as moléculas de ciprofloxacina e de PEG, pois quando o polímero se encontra em concentrações baixas tende a recusar as moléculas do antibiótico fazendo-o deslocar-se para a fase inferior.

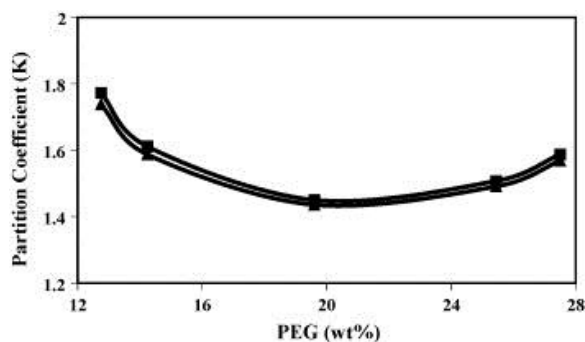


Figura 8: Efeito da concentração de PEG na partição de ciprofloxacina (Mokhtarani et al., 2008).

A temperatura tem um efeito semelhante ao descrito anteriormente e revela, ainda, alguma influência na partição do antibiótico (Fig.9). A altas temperaturas observam-se coeficientes de partição mais baixos, mas com tendência a aumentar (a partir de 23° aproximadamente), enquanto que a temperaturas mais baixas os coeficientes de partição têm tendência a diminuir (de 10 a 23 ° aproximadamente).

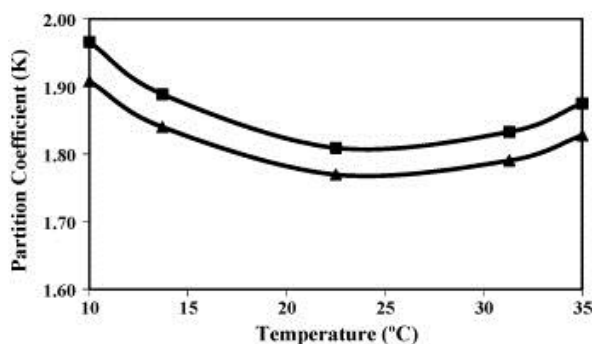


Figura 9: Efeito da temperatura da partição da ciprofloxacina (Mokhtarani et al., 2008).

Após a observação de todos estes factores, o estudo conclui que o peso (%) em percentagem da ciprofloxacina, a temperatura e a concentração de polímero têm um efeito relativamente pequeno em comparação com a concentração do sal presente na composição do sistema (Mokhtarani et al., 2008).

### 3.2.2. Estudos dos factores que influenciam o sistema no Ácido Clavulânico

O ácido clavulânico (CA) é um antibiótico que pertence à família dos  $\beta$ -lactâmicos, o grupo mais importante dos antibióticos. Este é produzido pela cultura de *Streptomyces clavuligerus* a 28 °C em meio complexo.

Silva, Bovarotti, Rodrigues, Hokka e Barboza (2009) analisaram os efeitos dos parâmetros envolvidos na recuperação e purificação do AC através de SBA constituídos por PEG/fosfato de potássio. Este estudo envolveu uma optimização da extracção do AC, uma vez que noutros estudos onde a utilização dos SBA é a principal aplicação para a separação e purificação de antibióticos, os parâmetros que podem influenciar o coeficiente de distribuição, o rendimento e factor de pureza ainda não tinham sido estabelecidos.

Assim, verificou-se que para conseguir essa optimização de rendimento e purificação o sistema deveria ter: massa molecular de PEG 400, pH 6,4, comprimento de *tie-line* 42 e que a razão do volume entre as duas fases deveria ser de 1,3, o que vai

corresponder a um rendimento aproximado de 100% e a um factor de purificação de 1,5 (C. S. Silva, Bovarotti, Rodrigues, Hokka, & Barboza, 2009).

Em 2012, Pereira e os seus colaboradores estudaram a estabilidade e partição do AC a partir de um SBA mais económico, constituído por PEG/ poliacrilato de sódio (NaPA), estudaram também o efeito do peso molecular do PEG e a concentração do polímero na partição comercial do AC (Pereira et al., 2012). Para a formação do sistema juntou-se aos polímeros um sal (NaCl ou Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

De forma a perceber a influência que a massa molecular de PEG poderia ter na partição do AC, fez-se um estudo com quatro tipos de PEG's diferentes (2000, 4000, 8000 e 10000 g/mol) e NaPA a 8000 g/mol, tendo com resultado o seguinte gráfico (Fig.10):

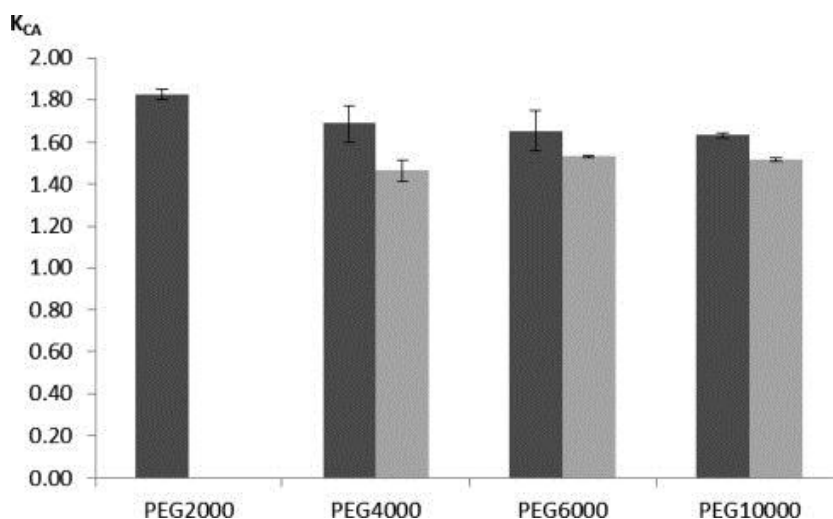


Figura 10: Resultados do coeficiente de partição do ácido clavulânico no sistema PEG/NaPA a 25°C. O cinzento-escuro corresponde ao sistema em que se adicionou 6% de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e o cinzento claro ao sistema a que se adicionou 1.05% de NaCl (Pereira et al., 2012).

Verificou-se que a partição do AC ocorria preferencialmente na fase rica em PEG com um coeficiente de partição entre 1 e 12 no sistema PEG/NaPA. Os resultados obtidos a partir do coeficiente de partição mostram ainda que este não é afectado significativamente pela presença de sais inorgânicos nem por PEG's de diferentes pesos moleculares.

O factor que é considerado um agente de influência significativa no K é a concentração do polímero, pois quanto maior a concentração na fase superior maior é o coeficiente de partição. No entanto, o tipo de sal também influencia a afinidade com a fase, neste caso a presença de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> contribui para que haja uma maior afinidade do AC para a fase superior em comparação com o NaCl.

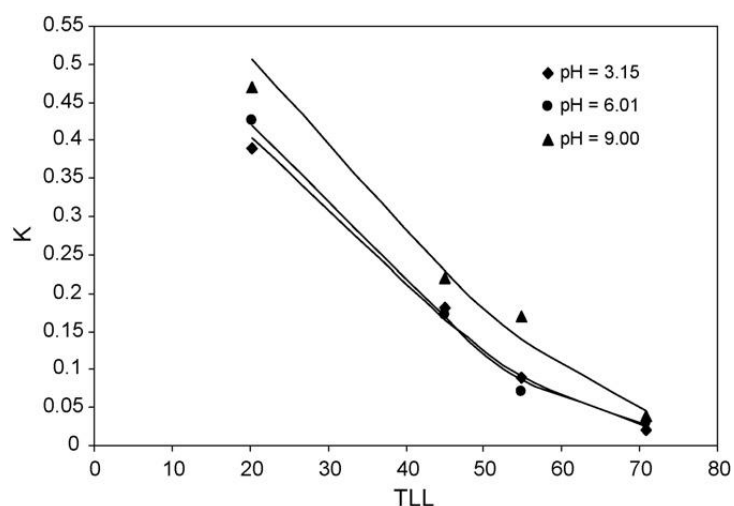
Após todas estas comparações, verificou-se que um sistema composto por 10% PEG 4000, 20% NaPA 8000 E 6% DE Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> seria a melhor escolha para a extracção de AC a partir do caldo fermentativo de *Streptomyces clavuligerus*. Este apresenta resultados competitivos com o processo de extracção comercial, podendo ser utilizado como novo processo de extracção e purificação do AC (Pereira et al., 2012).

### 3.3. Purificação de Aminoácidos

Uma das técnicas aplicadas à separação de aminoácidos é a cromatografia de contra-corrente (CCC). Este método faz um uso concomitante com o SBA, e por isso é considerada uma cromatografia de repartição liquido-líquido. No entanto, para que se possa obter uma purificação eficiente é necessário alcançar o coeficiente de partição dos aminoácidos e ter as condições necessárias para a sua formação. Com esse objectivo, Alireza e os seus colaboradores (2007) estudaram a partição de três aminoácidos (D-alanina, L-valina e L-leucina) num SBA constituído por PEG/ MgSO<sub>4</sub>.

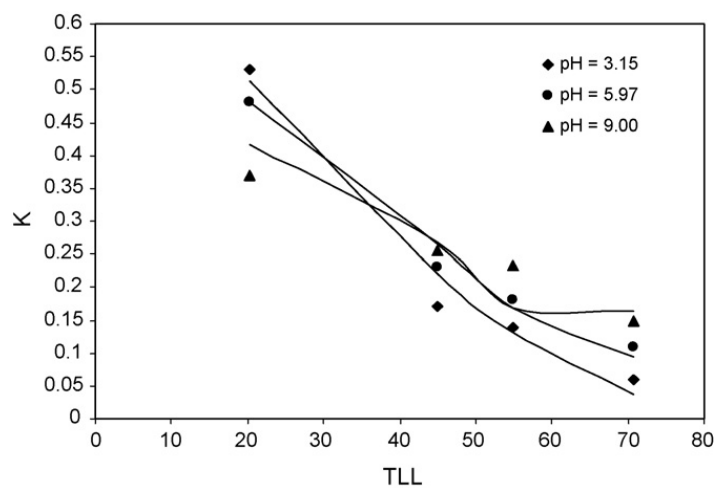
Os resultados mostraram que quanto mais hidrofóbico for o aminoácido, maior será o coeficiente de partição, pois vai ter mais afinidade com a fase hidrofóbica, ou seja, a fase constituída por PEG. Revelaram também que um aumento da tie-line (TLL) pode dar origem a coeficientes da partição mais baixos. Outro factor que pode afectar o valor de K é o pH e por isso também foi levado em conta neste estudo, no entanto verificou-se que tanto o pH como a concentração de aminoácido presente no SBA não têm grande interferência no seu comportamento (Salabat, Abnosi, & Bahar, 2007).

Todos estes resultados estão indicados gráfica e numericamente nas tabelas a baixo:



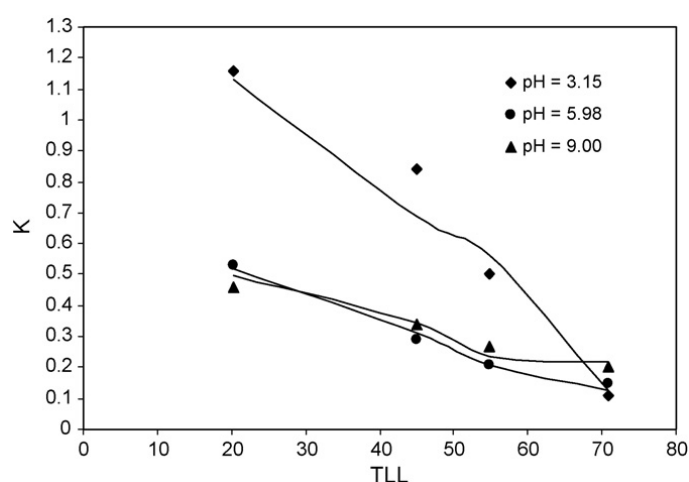
| TLL   | K<br>(pH =3.15) | K<br>(pH = 6.01) | K<br>(pH = 9.00) |
|-------|-----------------|------------------|------------------|
| 20.29 | 0.39            | 0.43             | 0.47             |
| 45.02 | 0.18            | 0.17             | 0.22             |
| 54.81 | 0.09            | 0.07             | 0.17             |
| 70.78 | 0.02            | 0.03             | 0.04             |

Figura 11: Resultados da comparação experimental dos coeficientes de partição da D-alanina e a função da *tie-line* com diferentes pH (Salabat et al., 2007).



| TLL   | K<br>(pH =3.15) | K<br>(pH = 5.97) | K<br>(pH = 9.00) |
|-------|-----------------|------------------|------------------|
| 20.29 | 0.53            | 0.48             | 0.37             |
| 45.02 | 0.14            | 0.23             | 0.26             |
| 54.81 | 0.17            | 0.12             | 0.23             |
| 70.78 | 0.06            | 0.11             | 0.12             |

Figura 12: Resultados da comparação experimental dos coeficientes de partição da L-valina e a função da *tie-line* com diferentes pH (Salabat et al., 2007).



| TLL   | K<br>(pH=3.15) | K<br>(pH = 5.98) | K<br>(pH = 9.00) |
|-------|----------------|------------------|------------------|
| 20.29 | 1.16           | 0.53             | 0.46             |
| 45.02 | 0.84           | 0.29             | 0.34             |
| 54.81 | 0.50           | 0.21             | 0.27             |
| 70.78 | 0.11           | 0.15             | 0.05             |

Figura 13: Resultados da comparação experimental dos coeficientes de partição da L-leucina e a função da *tie-line* com diferentes pH's (Salabat et al., 2007).

Estes resultados contribuem para que haja uma melhor selecção das condições para a purificação dos aminoácidos através do CCC (Salabat et al., 2007).

Em 2013, *de Barros* e os seus colaboradores descreveram um modelo que permite obter uma previsão do coeficiente de partição num sistema constituído por dois polímeros, usando como produto de estudo aminoácidos.

Neste estudo de partição deu-se especial interesse ao comportamento dos onze aminoácidos estudados (glicina, alanina, leucina, fenilamina, lisina, arginina, histidina, ácido aspártico, ácido glutâmico, glutamina e serina) em seis SBA diferentes. O coeficiente de partição destes nos diferentes SBA demonstra uma correlação linear como a descrita na equação de Collander (Equação.3). Esta equação dá-nos uma relação linear entre os logaritmos do coeficiente de partição dos solutos nos diferentes sistemas bifásicos.

$$\ln K_i = a_{ij} \ln K_j + b_{ij}$$

Equação 6: Equação de Collander:  $K_j$  e  $K_i$  – coeficientes de partição do soluto;  $a_{ij}$  e  $b_{ij}$  – constantes dependentes da composição das fases (De Barros et al., 2014).

Para este estudo dividiram-se os aminoácidos em quatro grupos classificados de acordo com as características químicas das suas cadeias laterais, como podemos ver na tabela a baixo (Tabela.5).

O coeficiente de partição destes é determinado em seis SBA diferentes: PEG/dextrano, PEG/Ficoll, Ficoll/dextrano, Ucon/dextrano, Ucon/PEG e Ucon/Ficoll, e para todos, os valores de K aumentam com a hidrofobicidade dos aminoácidos, sendo esta uma das principais influências no que diz respeito à alteração dos valores de K.

Tabela 5: Grupos de aminoácidos repartidos segundo as características químicas das suas cadeias laterais.

| Grupo      | Característica Química | Aminácidos      |
|------------|------------------------|-----------------|
| <b>I</b>   | Hidrofóbica<br>Apolar  | Glicina         |
|            |                        | Alanina         |
|            |                        | Leucina         |
|            |                        | Fenilamina      |
| <b>II</b>  | Polar                  | Serina          |
|            | Hidrofílica            |                 |
|            | Sem Carga              | Glutamina       |
| <b>III</b> | Carga Positiva         | Lisina          |
|            | Hidrofílica            | Arginina        |
|            |                        | Histidina       |
| <b>IV</b>  | Carga Negativa         | Ácido Aspártico |
|            | Hidrofílica            | Ácido Glutâmico |

Com base nos resultados obtidos, verificou-se que os sistemas PEG/dextrano e Ficoll/dextrano são os mais viáveis e que o método semi-empírico proposto para a previsão do K dos aminoácidos pode ser uma alternativa para a separação e purificação mais simplificada (De Barros et al., 2014).



## CAPÍTULO 4- Reciclagem dos Componentes do SBA

Os SBA mais utilizados são o PEG/sal e o PEG/dextrano. No entanto, devido à sua síntese complexa e aos custos elevados dos componentes necessários à formação das fases para operações de larga escala, a indústria investiu para estabelecer um processo mais económico e ecológico, através da recuperação dos componentes utilizados no SBA (Fig.14) (Ng et al., 2012).

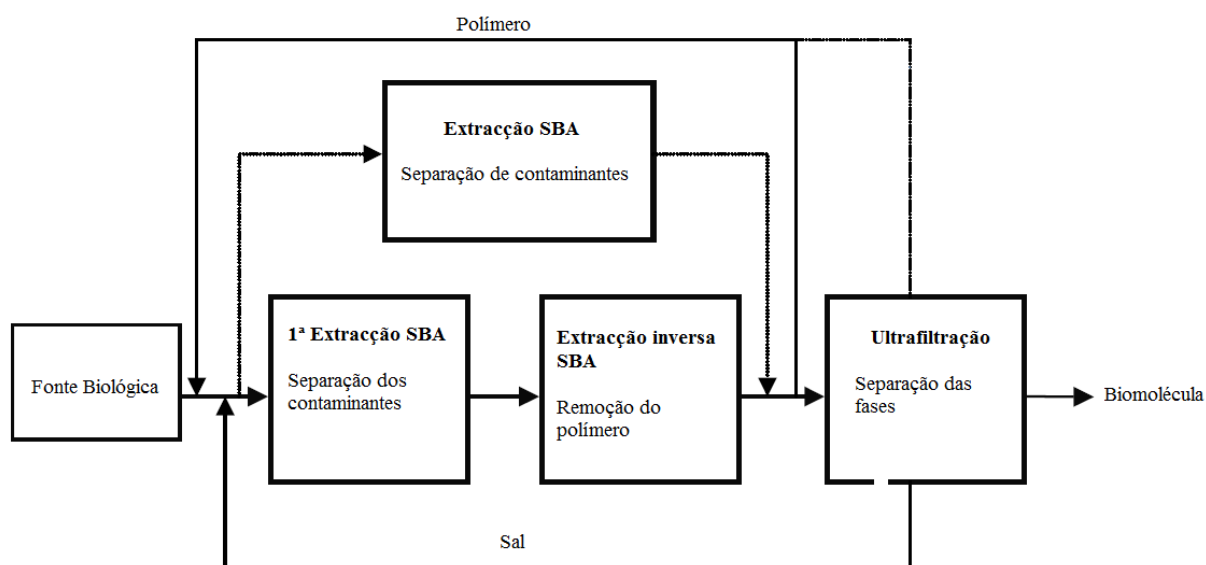


Figura 14: Partição através de SBA em uma ou duas etapas, com ultrafiltração (adaptado de (Rito-Palomares, 2004))

A forma simplificada do processo de recuperação do produto alvo com a reciclagem do polímero e do sal está representada na Figura 14. A primeira etapa é comum aos dois métodos descritos no esquema a cima (método com uma e com duas etapas), formam-se as duas fases do sistema, polímero-sal e junta-se o produto biológico.

No método que contém apenas uma etapa, as duas fases são separadas, a fase inferior rica em sal contém os contaminantes e a fase superior, rica em PEG, contém a biomolécula que se quer separar. Com a última etapa, a ultrafiltração, o PEG é reciclado e a biomolécula é recuperada. No método que contém duas etapas, após a partição da biomolécula, a fase inferior rica em sal onde se encontram os contaminantes é

descartada e através de uma extracção inversa é feita uma segunda extracção. Essa fase é adicionada uma nova fase rica em sal para a qual a biomolécula vai migrar, permitindo assim a reutilização da fase superior (fase rica em PEG). Ao contrário do primeiro método descrito, neste a fase sujeita à ultrafiltração é a fase rica em sal, sendo este o componente a ser reciclado e a biomolécula é recuperada (Rito-Palomares, 2004).

Estudos recentes revelaram um método alternativo para a recuperação dos componentes presentes em cada fase. Este método consiste na sua recuperação dos componentes da separação de fases pela indução da temperatura através da utilização de um polímero termosensível (EOPO) (Fig.15). Neste método forma-se um SBA primário onde a biomolécula alvo vai sofrer a sua partição para a fase superior, fase rica em EOPO. Esta fase é descartada e aquecida acima do ponto de turvação dos polímeros de forma a induzir a termo-separação de um novo sistema de duas fases. Este novo sistema é constituído por uma fase superior rica em água e uma fase inferior rica em polímero.

A biomolécula alvo é recolhida na fase mais rica em água, enquanto que o polímero pode ser recolhido a partir da fase inferior e o sal a partir de uma extracção subsequente (Ng et al., 2012).

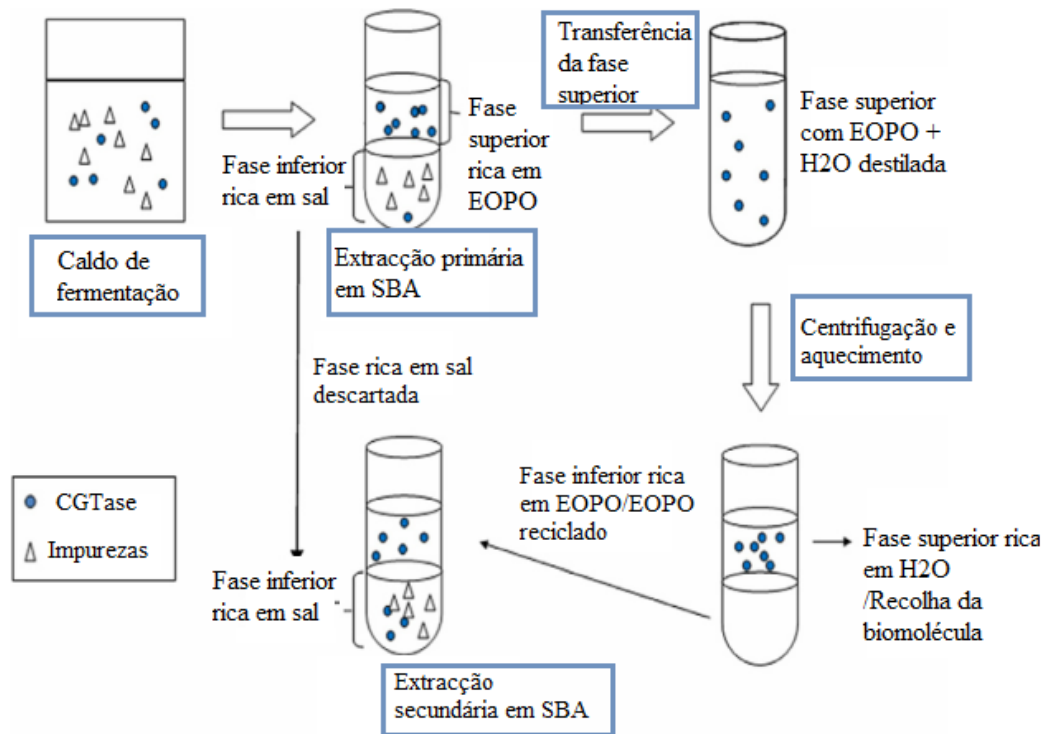


Figura 15: Purificação de CGTase num SBA constituído por EOPO/fosfato e a sua reciclagem por termo-separação, adaptado de (Ng et al., 2012).

Este método demonstrou ser eficiente, apresentando um factor de purificação final de 13.1 e um rendimento de 87%. No que diz respeito à recuperação dos componentes do sistema também se verificou que o método era eficiente pois recuperou-se mais de 80% do polímero EOPO, demonstrando assim que se pode reciclar e reutilizar os componentes do sistema (Ng et al., 2012).



## **CAPÍTULO 5 – Produção em larga escala com o SBA**

O processo a jusante representa, normalmente, 50 a 80% dos custos totais na produção de biomoléculas, como enzimas e proteínas. Os métodos convencionais utilizados na purificação de biomoléculas têm um preço bastante elevado, pois envolvem inúmeras operações unitárias, os reagentes necessários são dispendiosos e a sua reprodução em larga escala é difícil de realizar. (Rodríguez-Durán, Spelzini, Boeris, Aguilar, & Picó, 2013).

Os SBA têm sido utilizados, de forma eficiente, na recuperação e purificação em de biomoléculas. Estes apresentam inúmeras vantagens em comparação com os métodos tradicionais tais como uma baixa tensão interfacial, rápida deslocação de massa e grande quantidade de água nas duas fases (Hou & Cao, 2014). Estas vantagens contribuem para a possibilidade de uma produção em larga escala da biomolécula alvo (Ng et al., 2012). No entanto, apesar do extenso conhecimento dos SBA nessa área, a sua aplicação para procedimentos de larga escala ainda está em aberto (Prinz et al., 2014).

Os sistemas mais indicados para a produção em larga escala são os constituídos por polímero/sal pois são mais rentáveis, economicamente, e permitem uma separação das fases mais rápida quando comparado como o sistema polímero/polímero (Quijano, Hernandez, Thalasso, Muñoz, & Villaverde, 2009).

A indústria ainda se depara com alguns problemas no que diz respeito ao uso de SBA, pois a concentração de sal necessária para a formação de duas fases distintas é bastante elevada, levando à formação de resíduos com alta carga poluente. Por esta razão sugere-se a substituição do fosfato por sais como o citrato, pois são biodegradáveis e têm baixa toxicidade ambiental (Ramya Devi, Subathira, & Saravanan, 2013). Outra das preocupações diz respeito à quantidade de água necessária para a formação dos SBA, pois apesar de já serem constituídos por uma elevada concentração de água para que consigam uma acção favoráveis às biomoléculas, a nível industrial seria necessário quantidades muito maiores de forma a favorecer a formação do sistema (Cunha & Aires-Barros, 2002).

Para minorar a resistência da indústria à utilizada deste tipo de sistema, introduziu-se um SBA de operação contínua. Este faz uma partição contínua dos solutos, demonstrando que este é adequado para a partição contínua das biomoléculas e uma recuperação superior a 90%, pois diminui a quantidade de produto perdido na interface ao contrário do SBA simples (Vázquez-Villegas, Aguilar, & Rito-Palomares, 2011).

É, então, imprescindível que haja resultados eficientes quer no campo ecológico como no económico para resolver os problemas relativos aos processos de purificação e assim utilizar os SBA como alternativa.

Este método apresenta vantagens vantajosas para o meio industrial como: rápido processamento de grandes volumes, o que permite minimizar os custos laborais e energéticos, e por isso quando comparado com outros métodos é menos dispendioso (Diamond & Hsu, 1992).

### **5.1. Optimização dos SBA**

A recuperação de biomoléculas a partir do SBA é influenciada por vários factores: constituintes das fases e a sua concentração, pH, temperatura, *tie-lines* e concentração do produto alvo. De forma a optimizar os SBA a indústria têm investido intensivamente em investigação, aumentando assim o custo final (Raja et al., 2012).

Procuram-se estratégias que permitam um teste rápido a todos os parâmetros relevantes ao sistema, permitindo estabelecer condições para uma separação eficiente de biomoléculas e testar o vigor do processo e os seus parâmetros de dependência. Todos estes parâmetros facilitam a utilização dos SBA (Bensch et al., 2007).

O planeamento de ensaios (PDE) e métodos estatísticos como o planeamento factorial (PF) são alguns dos métodos utilizados para a optimização da partição de biomoléculas.

O PDE consiste na realização do menor número possível de ensaios com combinações particulares de níveis factoriais. Envolve a alteração de todas as variáveis significativas do processo de uma experiência para outra. Este método resume-se em

cinco etapas (Fig.14): levantamento das variáveis significativas, optimização em bruto, optimização final, resolução do modelo e a sua validação (Raja et al., 2012).

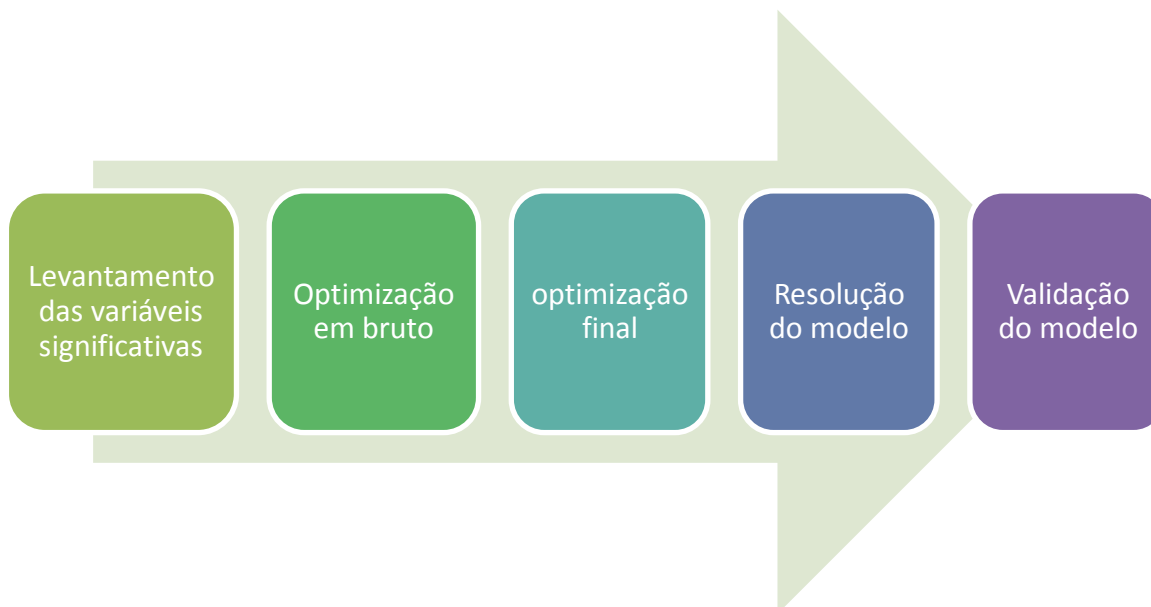


Figura 16: Etapas gerais no PDE, adaptado de (Raja et al., 2012).

A primeira etapa, levantamento das variáveis significativas, consiste em seleccionar através de combinações, as variáveis que afectam a resposta do processo: factor de rendimento e factor de purificação. Este pode ser feito através de dois métodos *Full Factorial Design* (FFD) ou por *Plackett – Burman Design* (PBD). O PBD é o método mais utilizado como ensaio de rastreio, pois permite estudar a mesma quantidade de variáveis como um número mais reduzido de ensaios.

De seguida segue-se a optimização em bruto que é executada pelo ajustamento do nível das variáveis significativas até se conseguir atingir uma resposta óptima do processo. Esta fase vai optimizar o nível das variáveis significativas estudadas anteriormente.

Na fase da optimização final é utilizada a metodologia de *Response Surface* (RSM) com o objectivo de colectar e ajustar os dados experimentais de forma a construir uma equação quadrática. Esta equação permite uma uniformização e previsão

da resposta e é seleccionada através de regressão linear que faça uma descrição mais exacta dos dados, sendo depois analisada.

Após as optimizações feitas ao sistema, é chegada a altura para a resolução do modelo. A equação quadrática obtida na fase anterior é resolvida analiticamente, visualizada graficamente ou através de um *software* estatístico de forma a encontrar os valores mais favoráveis ao processo para maximizar a sua resposta.

A etapa final do PDE corresponde à validação do modelo. Nesta etapa os ensaios devem ser conduzidos com os valores seleccionados nas fases anteriores. O modelo é considerado válido se a diferença entre a resposta observada e a resposta real for mínima (Raja et al., 2012).

## **5.2. Equipamentos**

A escolha dos equipamentos é um dos principais factores para o sucesso da extração e purificação de biomoléculas, tanto a nível de económico como a nível de eficiência (P. A J Rosa et al., 2011). Estes devem ser seleccionados tendo em conta os parâmetros físico-químicos das biomoléculas, como a viscosidade, a tensão interfacial e a diferença de densidade entre as duas fases (Cunha & Aires-Barros, 2002).

Os SBA apresentam uma grande vantagem pois podem utilizar os mesmos equipamentos utilizados nos métodos tradicionais para a extracção e purificação de biomoléculas.

Em laboratório, quando é feita uma extracção em pequena escala é utilizada uma ampola de decantação. Após a junção dos dois componentes do sistema, ocorre a separação de fases e é recolhida a fase com a densidade mais alta para um recipiente (Kilikian, B V , Pessoa Jr, 2005).

Este método é definido como método descontínuo e foi a partir do seu sucesso que se verificou a possibilidade da sua aplicação a nível industrial para a recuperação em larga escala de biomoléculas. No entanto a falta de compreensão dos mecanismos de

partição destas no SBA e a utilização do equipamento de processos descontínuos contribuiu para que a indústria se retraísse na sua utilização (P.A.J. Rosaa, A.M. Azevedoa, S. Sommerfeldb, W. Bäcker b, 2012).

Mais tarde verificou-se que as colunas de extracção utilizadas nos procedimentos de extracção liquido-líquido convencionais podiam ser adaptadas aos SBA (P.A.J. Rosaa, A.M. Azevedoa, S. Sommerfeldb, W. Bäcker b, 2012). A selecção das colunas também vai depender das necessidades do processo, das propriedades das biomoléculas e do tipo de SBA utilizado. Estas podem actuar deixando uma fase estacionária ou comum fluxo contracorrente nas duas fases (Cunha & Aires-Barros, 2002).

A utilização conjunta das colunas de extracção e dos SBA apresenta ainda assim desvantagens no que diz respeito à formação de pequenas gotículas, levando à diminuição do desempenho do processo e à inundação da coluna (Cunha & Aires-Barros, 2002).

A extração industrial de biomoléculas é efectuada por equipamentos que relacionam as duas fases de forma a promover a partição das biomoléculas. Este efeito pode ser feito através da acção da gravidade, com misturadores-decantadores ou colunas de extracção, ou através da utilização de centrifugadoras. A utilização da primeira técnica só pode ser utilizada em sistemas que tenham uma velocidade de partição elevada.

Os misturadores-decantadores (Fig.17) são exemplos de equipamentos que trabalham com a acção da gravidade. Têm na sua constituição dois tanques, um contém um agitador central para garantir a mistura das fases, e o outro permite a separação das mesmas. Esta operação pode ocorrer de duas formas distintas, contínua ou descontínua. A fase contínua necessita de dois tanques separados, enquanto que a descontínua necessita apenas de um tanque (Cunha & Aires-Barros, 2002).

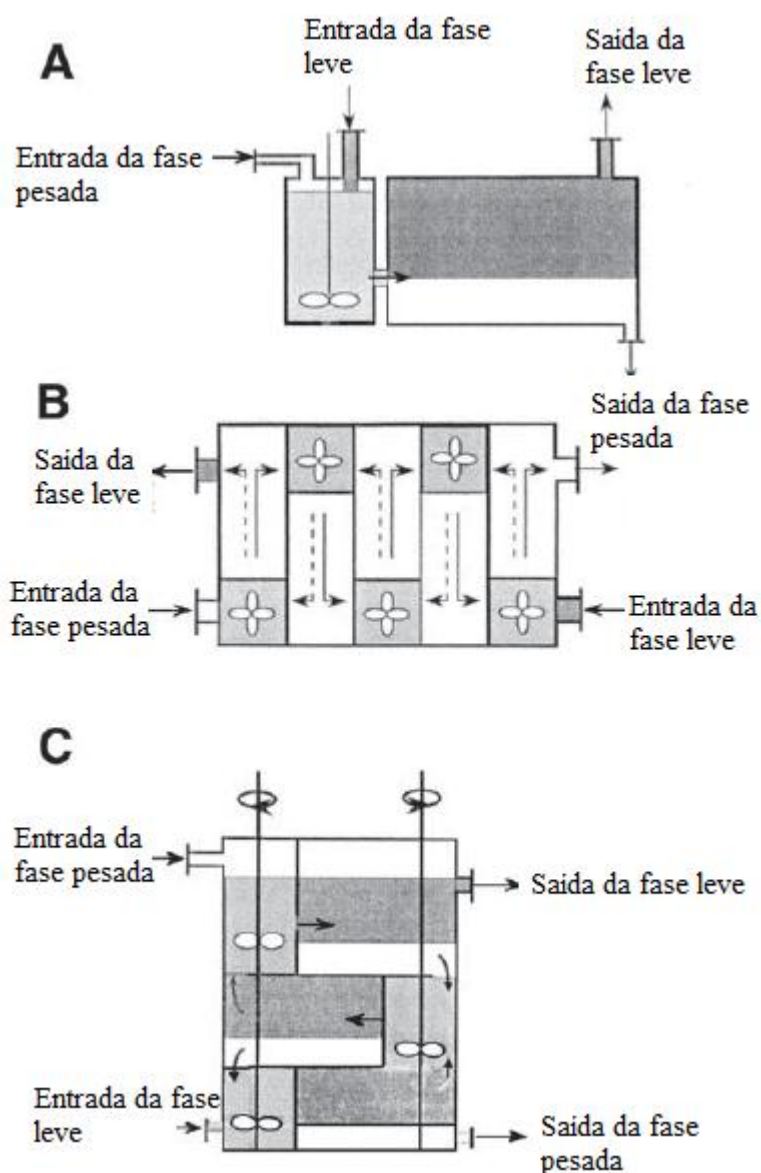


Figura 17: A- Misturador-decantador para extração de biomoléculas; B- Modelo horizontal, C- Modelo vertical(Cunha & Aires-Barros, 2002).

As colunas de extração permitem fazer uma melhoria da operação, tornando-a mais eficiente. Existem dois tipos de colunas, as que são agitadas mecanicamente, como é o caso das colunas que contêm discos giratórios (Fig.18), e colunas que sem agitação, como é o caso das colunas *Spray* (Fig.19) (Cunha & Aires-Barros, 2002).

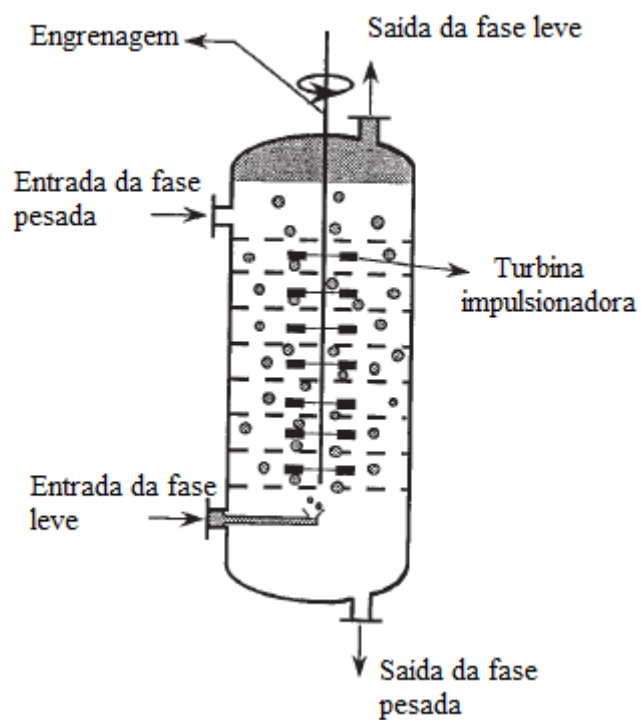


Figura 18: Exemplo de coluna agitada mecanicamente (Cunha & Aires-Barros, 2002).

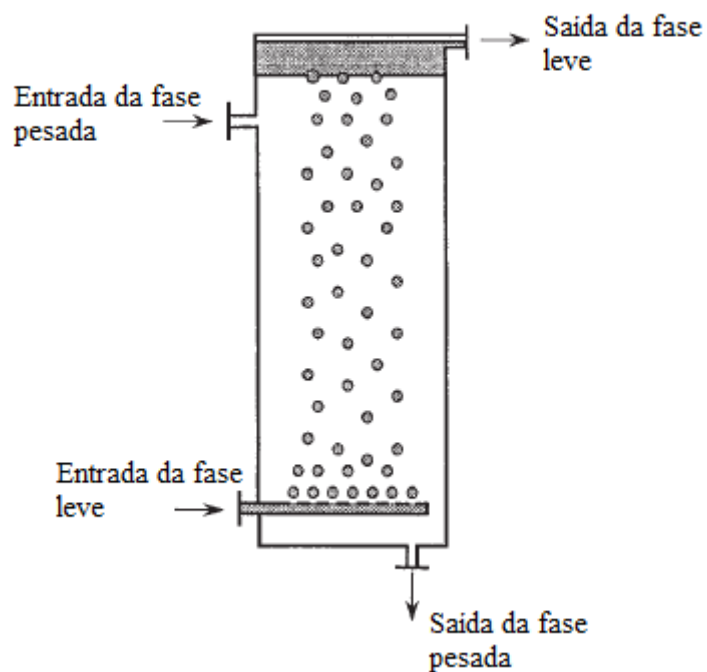


Figura 19: Exemplo de coluna sem agitação, coluna *spray* (Cunha & Aires-Barros, 2002).

No entanto, existem casos em que o tempo de separação das duas fases é mais elevado, para tal são utilizadas centrífugas que promovem a separação destas com a força da gravidade (Fig.20). Este equipamento é muito utilizado para a extracção contínua de biomoléculas intracelulares a partir de SBA constituídos por PEG/sal(Cunha & Aires-Barros, 2002).

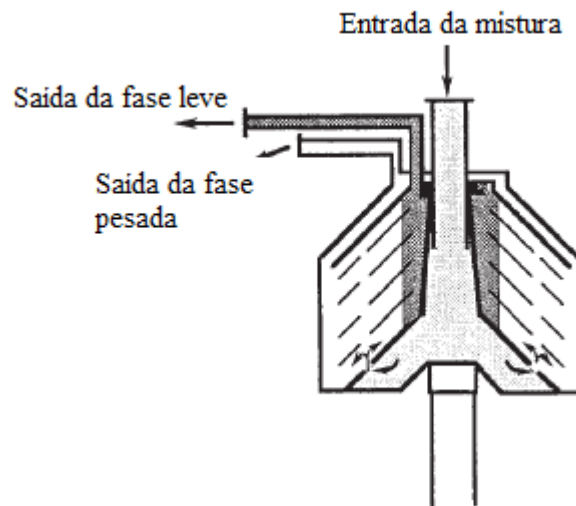


Figura 20: Equipamento de centrifugação (Cunha & Aires-Barros, 2002).

É importante que na produção de biomoléculas, o processo de produção e recuperação estejam integrados de forma a desenvolver um bioprocesso eficiente e em larga escala (Kilikian, B V , Pessoa Jr, 2005).

## **CAPÍTULO 6 - Abordagem Económica e Ecológica do SBA**

A indústria da biotecnologia enfrenta, hoje em dia, grandes desafios devido ao aumento da procura de produtos para terapia humana, com origem biotecnológica (P. A J Rosa et al., 2011).

Os produtos biofarmacêuticos têm um grande peso no tratamento de inúmeras doenças, e por vezes são os únicos com aprovação para o tratamento das mesmas. Neste tipo de produtos são incluídas as proteínas, antibióticos, anticorpos, enzimas e ácidos nucleicos, que podem ser aplicados em várias áreas como a terapêutica autoimune, vacinação, oncologia, cardiovascular e neurológica (P. a J. Rosa et al., 2010). Este facto levou a que a indústria investisse cada vez mais na optimização dos processos necessários à produção destas substâncias e desse cada vez mais interesse aos seus aspectos económicos e ecológicos.

Tal como descrito na introdução desta dissertação os métodos usuais apresentavam certas limitações, embora ainda sejam utilizados actualmente. Os métodos cromatográficos são bons exemplos: continuam a ser os métodos mais utilizados para a extracção e purificação de biomoléculas mas têm limitações ao nível da produção em escala, ao nível ecológico e no elevado preço das matérias-primas utilizadas (P. A J Rosa et al., 2011).

A partição com SBA revelou melhorias consideráveis em todas essas limitações, combinando ainda uma alta biocompatibilidade e selectividade com as biomoléculas (Albertsson, Cajaville, Brooks, & Tjerneld, 1987).

O estudo realizado por Rosa, Azevedo, Sommerfeld, Bäcker e Aires-Baker, em 2011, mostrou isso mesmo. A investigação foi realizada para a produção de anticorpos monoclonais através da sua extracção por SBA, por estes serem biomoléculas que têm uma das produções mais dispendiosas no mercado (Elvin, Couston, & Van Der Walle, 2013).

Os custos do processo podem ser divididos em duas variáveis distintas, a fixa e a variável (Fig.21):

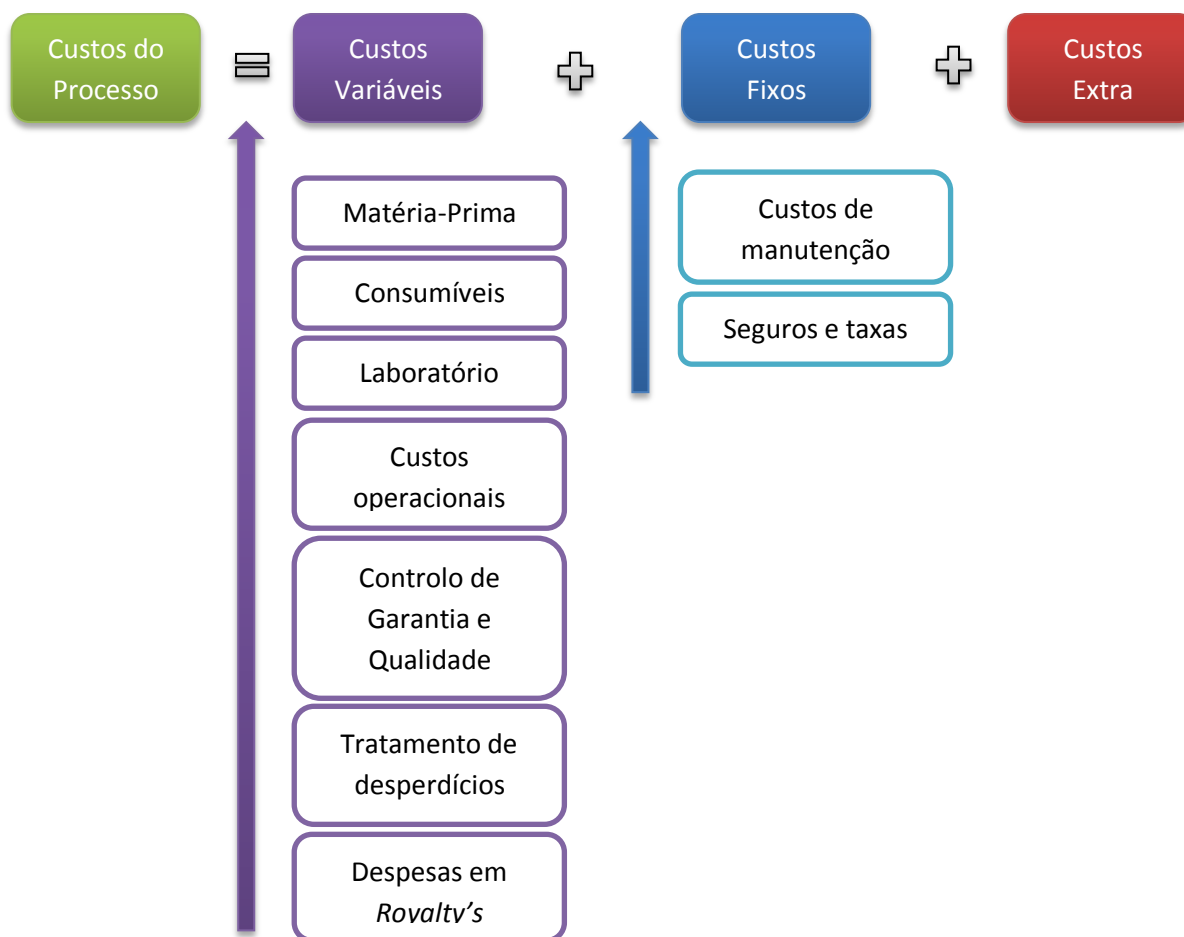


Figura 21: Custos de produção (adaptado de (P. a J. Rosa, Azevedo, Sommerfeld, Bäcker, & Aires-Barros, 2011))

Através deste estudo comprovou-se que a cromatografia com resina rica em proteína A (ProA) tem sido o método escolhido para a purificação de anticorpos, no entanto este método apresenta algumas desvantagens tais como um custo elevado de produção, formação de agregados de alto peso molecular durante a produção, baixo rendimento e pouca reprodutibilidade em larga escala (Gottschalk, 2008). Por essa razão passou a utilizar-se o SBA, pois este apresentava condições mais vantajosas em termos económicos uma vez que permitia a redução dos custos anuais variáveis e era capaz de purificar a mesma quantidade de anticorpos que o método de ProA, mas de forma

contínua (P. a J. Rosa et al., 2011). Assim, um processo industrial que utilize o SBA pode ser uma alternativa à cromatografia por afinidade ou a tradicional (Ruiz-Ruiz et al., 2012).

A componente ecológica dos métodos de produção tem-se destacado cada vez mais na indústria (Fig.22), sendo um dos factores determinantes para o início da produção de biomoléculas (Heinzle, Biwer, & Cooney, 2006).

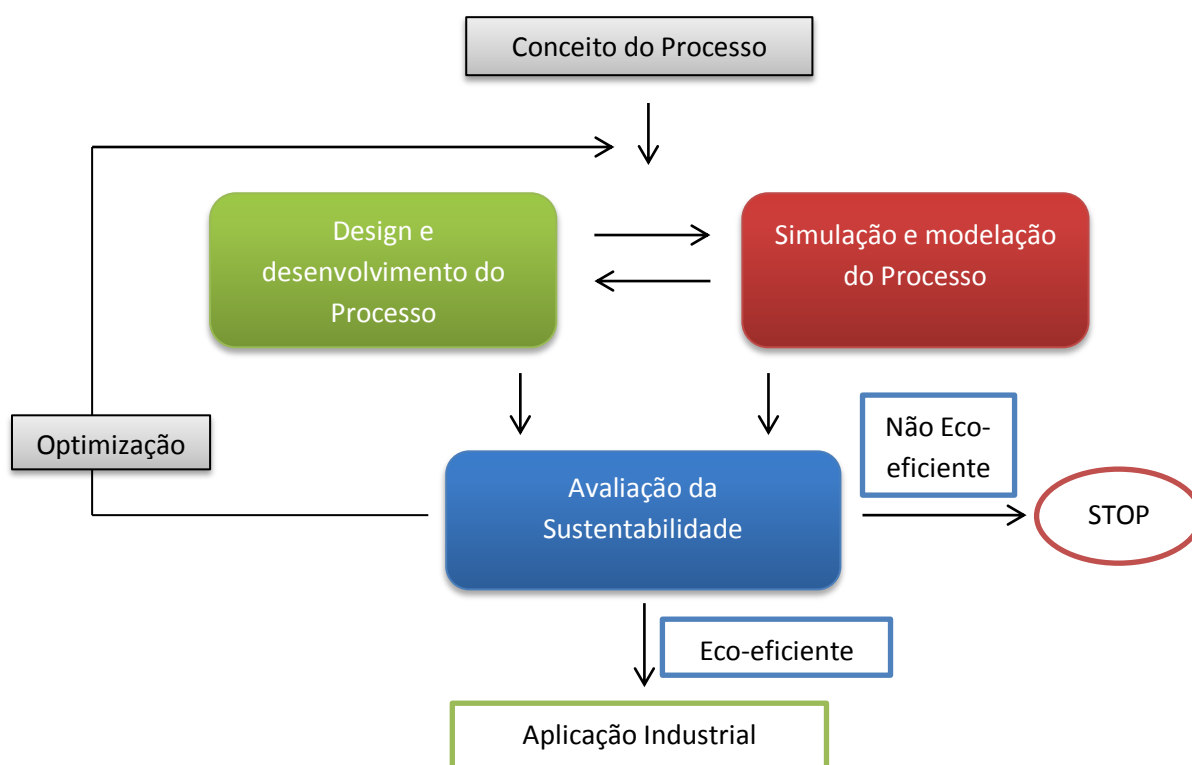


Figura 22: Desenvolvimento de bioprocessos, adaptado de (Heinzle et al., 2006).

No estudo referido a cima foi utilizado um método desenvolvido por *Biwer e Heinzle*, em 2004. Este método baseia-se na definição de catorze categorias de impacto, e incluem efeitos relevantes provocados por um composto específico ao meio ambiente e à saúde humana. Cada composto é avaliado através de uma classificação ABC (alta, média e baixa) de acordo com as suas propriedades ambientais e o potencial que apresenta para causar impactos ambientais (Biwer & Heinzle, 2004).

As categorias são divididas em seis grupos de impacto: risco inerente, organismos, recursos, ar/ água e solo e *gray input*. As informações reunidas nestes

grupos são, então, transvertidas em factores ambientais (FA), que representam a relevância de um componente em relação a aspectos ambientais e de saúde.

Os FA são determinados separadamente para cada composto *input* e *output*. Os primeiros avaliam o impacto de cada composto relativamente à sua origem e disponibilidade, complexidade de síntese, propriedades toxicológicas para o organismo e o seu possível impacto negativo para o processo a desenvolver, enquanto que os *output* avaliam o composto relativamente ao seu impacto para o ambiente após a sua eliminação. Além disso avaliam as propriedades toxicológicas do composto e o seu impacto no processo, tal como os FA *input* (Biwer & Heinzle, 2004).

Os FA *input* e *output* das matérias-primas utilizadas nos dois métodos estudados estão representados na Tabela 6:

Tabela 6: índice de massa das matérias-primas utilizadas e os seus respectivos factores ambientais *input* e *output* (adaptado de (P. a J. Rosa et al., 2011)).

| Matérias-primas     | Índice de massa<br>(Kg/Kg anticorpo) |      | FA<br>(MI/ Kg) |               |
|---------------------|--------------------------------------|------|----------------|---------------|
|                     | ATPE                                 | ProA | <i>input</i>   | <i>output</i> |
| Fosfato de sódio    | 245                                  | 1.9  | 0.075          | 0.325         |
| Fosfato de potássio | 193                                  | ---  | 0.075          | 0.325         |
| Cloreto de sódio    | 247                                  | 6.2  | 0              | 0             |
| PEG 3350            | 663                                  | ---  | 0.150          | 0.075         |
| Hidróxido de sódio  | 1.2                                  | 0.3  | 0.400          | 0.325         |
| Citrato de sódio    | ---                                  | 7.2  | 0.075          | 0.075         |

O fosfato representa a matéria-prima com mais impacto ambiental, especialmente no *input* devido ao seu elevado potencial de eutrofização. Devido à sua síntese complexa e à necessidade de utilização de recursos e matérias não renováveis, o PEG que é utilizado no SBA apresenta um maior impacto ambiental no *input*.

## **CAPÍTULO 7 – Considerações Finais**

Ao longo dos anos e com as novas necessidades por parte da indústria em relação à obtenção de biomoléculas para acompanhar as necessidades do humano, a biotecnologia deparou-se com um novo desafio: como conseguir extrair e purificar biomoléculas em menos tempo, de forma a reduzir o número de operações realizadas, como conseguir um grau elevado de pureza e como fazê-lo de forma mais económica e ecológica (Asenjo & Andrews, 2012; Benavides & Monterrey, 2011).

A aplicação prática dos SBA para a recuperação de produtos biológicos foi, inicialmente, focalizada para a fase inicial da purificação de proteínas. No entanto, surgiram novas tendências, e consequentemente uma nova reestruturação do tipo de produto-alvo. Dentro destes podemos destacar os anticorpos, os antibióticos, aminoácidos e enzimas.

Apesar de ser uma técnica que apresenta várias vantagens relativamente aos processos tradicionalmente utilizados, ainda não está completamente integrada industrialmente, pois o custo dos componentes necessários para a formação de fases e a complexidade da síntese e do comportamento do SBA ainda são alguns dos pontos por solucionar.

Verificou-se que ainda existem alguns ajustes a fazer para optimização dos SBA. É necessário entender quais as concentrações ideais para a formação de duas fases distintas, a sua selectividade e o mecanismo molecular da partição do produto-alvo. Para tal podem ser utilizados sistemas modelos pré-definidos que nos permitem prever o comportamento do soluto no sistema, contribuindo para uma informação de partição mais exacta. No entanto, ainda existem muitos conceitos por compreender e é necessário continuar a investigação no que diz respeito a estes.

A investigação da aplicação dos SBA na recuperação de biomoléculas a partir de fontes diferentes permitiu o desenvolvimento de processos de fácil aplicação industrial, com operações contínuas e biocompatíveis, o que fez com que esta fosse considerada uma técnica promissora para a purificação de bioprodutos de interesse farmacêuticos.

Os SBA podem ainda ser combinados como os métodos de extracção convencionais no processamento a jusante, como a cromatografia, para uma purificação mais eficiente do produto-alvo.

A extracção com SBA continua, ainda, a ser alvo de estudo por parte da biotecnologia, pois a indústria ainda mostra alguma relutância no que diz respeito à sua utilização. No entanto, as suas vantagens e a necessidade de métodos alternativos para a extração e purificação de biomoléculas contribuem para o seu elevado potencial de aplicação nas mais variadas áreas.

## Bibliografia

- Albertsson, P. A. (1970). Partition of cell particles and macromolecules in polymer two-phase systems. *Advances in Protein Chemistry*, 24, 309–341. doi:10.1002/cbf.290050311
- Albertsson, P. A., Cajarville, A., Brooks, D. E., & Tjerneld, F. (1987). Partition of proteins in aqueous polymer two-phase systems and the effect of molecular weight of the polymer. *Biochimica et Biophysica Acta*, 926, 87–93.
- Asenjo, J. a, & Andrews, B. a. (2012). Aqueous two-phase systems for protein separation: phase separation and applications. *Journal of Chromatography. A*, 1238(September 2011), 1–10. doi:10.1016/j.chroma.2012.03.049
- Benavides, J., & Monterrey, T. De. (2011). *Aqueous Two-Phase Systems. Comprehensive Biotechnology* (Second Edi., Vol. 1, pp. 697–713). Elsevier B.V. doi:10.1016/B978-0-08-088504-9.00124-0
- Bensch, M., Selbach, B., & Hubbuch, J. (2007). High throughput screening techniques in downstream processing: Preparation, characterization and optimization of aqueous two-phase systems. *Chemical Engineering Science*, 62(7), 2011–2021. doi:10.1016/j.ces.2006.12.053
- Biwer, A., & Heinzle, E. (2004). Environmental assessment in early process development. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 79, 597–609. doi:10.1002/jctb.1027
- Braas, G. M. F., Walker, S. G., & Lyddiatt, A. (2000). Recovery in aqueous two-phase systems of nanoparticulates applied as surrogate mimics for viral gene therapy vectors. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 743, 409–419. doi:10.1016/S0378-4347(00)00056-6
- Cunha, T., & Aires-Barros, R. (2002). Large-scale extraction of proteins. *Molecular Biotechnology*, 20, 29–40. doi:10.1385/MB:20:1:029
- Daan J. A. Crommelin, R. D. S. (2004). *Pharmaceutical Biotechnology: Fundamentals and Applications, Second Edition*. Retrieved from <http://www.google.pt/books?hl=pt-PT&lr=&id=GjTpkvQDMogC&pgis=1>
- De Barros, D. P. C., Campos, S. R. R., Madeira, P. P., Azevedo, A. M., Baptista, A. M., & Aires-Barros, M. R. (2014). Modeling the partitioning of amino acids in aqueous two phase systems. *Journal of Chromatography A*, 1329, 52–60. doi:10.1016/j.chroma.2013.12.015

- Diamond, A. D., & Hsu, J. T. (1992). Aqueous two-phase systems for biomolecule separation. *Advances in Biochemical Engineering/biotechnology*, 47, 89–135.
- Doran, P. M. (2003). *Bioprocess Engineering Principles. Technology* (2nd ed., Vol. 9, pp. 133–135). doi:10.1016/S0892-6875(96)90075-8
- Elvin, J. G., Couston, R. G., & Van Der Walle, C. F. (2013). Therapeutic antibodies: Market considerations, disease targets and bioprocessing. *International Journal of Pharmaceutics*, 440, 83–98. doi:10.1016/j.ijpharm.2011.12.039
- Ferreira, I. F., Azevedo, A. M., Rosa, P. A. J., & Aires-Barros, M. R. (2008). Purification of human immunoglobulin G by thermoseparating aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography A*, 1195, 94–100. doi:10.1016/j.chroma.2008.04.077
- Ferreira, L. A., Parpot, P., Teixeira, J. A., Mikheeva, L. M., & Zaslavsky, B. Y. (2012). Effect of NaCl additive on properties of aqueous PEG – sodium sulfate two-phase system. *Journal of Chromatography A*, 1220, 14–20. doi:10.1016/j.chroma.2011.12.001
- Gottschalk, U. (2008). Bioseparation in antibody manufacturing: the good, the bad and the ugly. *Biotechnology Progress*, 24(3), 496–503. doi:10.1021/bp070452g
- Heinzle, E., Biwer, A., & Cooney, C. (2006). *Development of sustainable bioprocesses: modeling and assessment* (p. 319). The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex PO19 8SQ, England: John Wiley & Sons Ltd. Retrieved from <http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=Co2IKvN6ZioC&oi=fnd&pg=PR7&dq=Development+of+Sustainable+Bioprocesses+Modeling+and+Assessment&ots=mlgpTw8W1j&sig=FvfzJl6MMsmM2wQp8RghHNb9HBI>
- Hou, D., & Cao, X. (2014). Synthesis of two thermo-responsive copolymers forming recyclable aqueous two-phase systems and its application in cefprozil partition. *Journal of Chromatography A*, 1349, 30–36. doi:10.1016/j.chroma.2014.04.075
- Kilikian, B V , Pessoa Jr, A. (2005). *Purificação de Produtos Biotecnológicos. Manole* (pp. 14–85).
- Lin, X., Wang, Y., Zeng, Q., Ding, X., & Chen, J. (2013). Extraction and separation of proteins by ionic liquid aqueous two-phase system. *The Analyst*, 138, 6445–53. doi:10.1039/c3an01301d
- Martins, J. P., Dos Reis Coimbra, J. S., De Oliveira, F. C., Sanaiotti, G., Da Silva, C. A. S., Da Silva, L. H. M., & Da Silva, M. D. C. H. (2010). Liquid-liquid equilibrium of aqueous two-phase system composed of poly(ethylene glycol) 400 and sulfate salts. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 55, 1247–1251. doi:10.1021/je9006162

- Mokhtarani, B., Karimzadeh, R., Amini, M. H., & Manesh, S. D. (2008). Partitioning of Ciprofloxacin in aqueous two-phase system of poly(ethylene glycol) and sodium sulphate. *Biochemical Engineering Journal*, 38(2), 241–247. doi:10.1016/j.bej.2007.07.009
- Molino, J. V. D., Viana Marques, D. de A., Júnior, A. P., Mazzola, P. G., & Gatti, M. S. V. (2013). Different types of aqueous two-phase systems for biomolecule and bioparticle extraction and purification. *Biotechnology Progress*, 29, 1343–1353. doi:10.1002/btpr.1792
- Negrete, A., Ling, T. C., & Lyddiatt, A. (2007). Aqueous two-phase recovery of bio-nanoparticles: A miniaturization study for the recovery of bacteriophage T4. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 854, 13–19. doi:10.1016/j.jchromb.2007.03.041
- Ng, H. S., Tan, C. P., Mokhtar, M. N., Ibrahim, S., Ariff, A., Ooi, C. W., & Ling, T. C. (2012). Recovery of Bacillus cereus cyclodextrin glycosyltransferase and recycling of phase components in an aqueous two-phase system using thermo-separating polymer. *Separation and Purification Technology*, 89, 9–15. doi:10.1016/j.seppur.2011.12.028
- P.A.J. Rosaa, A.M. Azevedoa, S. Sommerfeldb, W. Bäcker b, M. R. A.-B. a. (2012). Continuous aqueous two-phase extraction of human antibodies using a packed column. *Journal of Chromatography B*, 148–156.
- Passos, H., Trindade, M. P., Vaz, T. S. M., Da Costa, L. P., Freire, M. G., & Coutinho, J. A. P. (2013). The impact of self-aggregation on the extraction of biomolecules in ionic-liquid-based aqueous two-phase systems. *Separation and Purification Technology*, 108, 174–180. doi:10.1016/j.seppur.2013.02.008
- Pereira, J. F. B., Santos, V. C., Johansson, H.-O., Teixeira, J. A. C., & Pessoa Jr., A. (2012). A stable liquid–liquid extraction system for clavulanic acid using polymer-based aqueous two-phase systems. *Separation and Purification Technology*, 98, 441–450. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.seppur.2012.08.008
- Prinz, A., Koch, K., Górak, A., & Zeiner, T. (2014). Multi-stage laccase extraction and separation using aqueous two-phase systems: Experiment and model. *Process Biochemistry*, 49(6), 1020–1031. doi:10.1016/j.procbio.2014.03.011
- Quijano, G., Hernandez, M., Thalasso, F., Muñoz, R., & Villaverde, S. (2009). Two-phase partitioning bioreactors in environmental biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*. doi:10.1007/s00253-009-2158-6
- Raja, S., & Murty, V. R. (2012). Development and Evaluation of Environmentally Benign Aqueous Two Phase Systems for the Recovery of Proteins from Tannery Waste Water. *ISRN Chemical Engineering*, 2012, 1–9. doi:10.5402/2012/290471

- Raja, S., Murty, V. R., Thivaharan, V., Rajasekar, V., & Ramesh, V. (2012). Aqueous Two Phase Systems for the Recovery of Biomolecules – A Review. *Science and Technology*. doi:10.5923/j.scit.20110101.02
- Ramyadevi, D., Subathira, A., & Saravanan, S. (2013). Protein Recovery From Shrimp Waste Using Aqueous Two Phase System: Effect Of Process Parameters On Partitioning Using Response Surface Methodology. *International Journal of Chemicaltechnology Research*, 5(1), 156–166.
- Ratanapongleka, K. (2010). Recovery of Biological Products in Aqueous Two Phase Systems. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*, 1, 191–198. doi:10.7763/IJCEA.2010.V1.33
- Reschke, T., Brandenbusch, C., & Sadowski, G. (2014). Modeling aqueous two-phase systems: I. Polyethylene glycol and inorganic salts as ATPS former. *Fluid Phase Equilibria*, 368, 91–103. doi:10.1016/j.fluid.2014.02.016
- Rito-Palomares, M. (2004). Practical application of aqueous two-phase partition to process development for the recovery of biological products. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 807(1), 3–11. doi:10.1016/j.jchromb.2004.01.008
- Rodríguez-Durán, L. V., Spelzini, D., Boeris, V., Aguilar, C. N., & Picó, G. A. (2013). Partition in aqueous two-phase system: Its application in downstream processing of tannase from *Aspergillus niger*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 101, 392–397. doi:10.1016/j.colsurfb.2012.07.023
- Rosa, P. a J., Azevedo, a M., Sommerfeld, S., Bäcker, W., & Aires-Barros, M. R. (2011). Aqueous two-phase extraction as a platform in the biomanufacturing industry: economical and environmental sustainability. *Biotechnology Advances*, 29(6), 559–67. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.03.006
- Rosa, P. a J., Ferreira, I. F., Azevedo, a M., & Aires-Barros, M. R. (2010). Aqueous two-phase systems: A viable platform in the manufacturing of biopharmaceuticals. *Journal of Chromatography. A*, 1217(16), 2296–305. doi:10.1016/j.chroma.2009.11.034
- Rosa, P. A. J., Azevedo, A. M., Sommerfeld, S., Bäcker, W., & Aires-Barros, M. R. (2011). Aqueous two-phase extraction as a platform in the biomanufacturing industry: Economical and environmental sustainability. *Biotechnology Advances*. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.03.006
- Rosa, P. A. J., Azevedo, A. M., Sommerfeld, S., Mutter, M., Aires-Barros, M. R., & Bäcker, W. (2009). Application of aqueous two-phase systems to antibody purification: A multi-stage approach. *Journal of Biotechnology*, 139, 306–313. doi:10.1016/j.jbiotec.2009.01.001

- Rosa, P. A. J., Azevedo, A. M., Sommerfeld, S., Mutter, M., Bäcker, W., & Aires-Barros, M. R. (2013). Continuous purification of antibodies from cell culture supernatant with aqueous two-phase systems: From concept to process. *Biotechnology Journal*, 8, 352–362. doi:10.1002/biot.201200031
- Ruiz-Ruiz, F., Benavides, J., Aguilar, O., & Rito-Palomares, M. (2012). Aqueous two-phase affinity partitioning systems: Current applications and trends. *Journal of Chromatography A*. doi:10.1016/j.chroma.2012.04.077
- Salabat, A., Abnosi, M. H., & Bahar, A. R. (2007). Amino acids partitioning in aqueous two-phase system of polypropylene glycol and magnesium sulfate. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 858(1-2), 234–8. doi:10.1016/j.jchromb.2007.08.039
- Silva, C. S., Bovarotti, E., Rodrigues, M. I., Hokka, C. O., & Barboza, M. (2009). Evaluation of the effects of the parameters involved in the purification of clavulanic acid from fermentation broth by aqueous two-phase systems. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 32, 625–632. doi:10.1007/s00449-008-0285-6
- Silva, D. F. C., Azevedo, A. M., Fernandes, P., Chu, V., Conde, J. P., & Aires-Barros, M. R. (2012). Design of a microfluidic platform for monoclonal antibody extraction using an aqueous two-phase system. *Journal of Chromatography A*, 1249, 1–7. doi:10.1016/j.chroma.2012.05.089
- Silva, L. H. M. da, & Loh, W. (2006). Sistemas aquosos bifásicos: fundamentos e aplicações para partição/purificação de proteínas. *Química Nova*, 29(6), 1345–1351. doi:10.1590/S0100-40422006000600033
- Vázquez-Villegas, P., Aguilar, O., & Rito-Palomares, M. (2011). Study of biomolecules partition coefficients on a novel continuous separator using polymer-salt aqueous two-phase systems. *Separation and Purification Technology*, 78, 69–75. doi:10.1016/j.seppur.2011.01.023
- Venâncio, A., Almeida, C., Domingues, L., & Teixeira, A. J. (1995). Protein partition on a derivate guar gum based aqueous two-phase system. *Kluwer Academic Publishers*, 5, 253–258.
- Wang, Y., Han, J., Xu, X., Hu, S., & Yan, Y. (2010). Partition behavior and partition mechanism of antibiotics in ethanol/2-propanol–ammonium sulfate aqueous two-phase systems. *Separation and Purification Technology*, 75(3), 352–357. doi:10.1016/j.seppur.2010.09.004

