UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímica – Farmacêutica
Área de Tecnologia Quimico-Farmacêutica

Extração de adenovírus em sistemas micelares de duas fases aquosas

João Vitor Dutra Molino

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior

São Paulo
2012

João Vitor Dutra Molino

Extração de Adenovírus em Sistemas Micelares de Duas Fases Aquosas

Dissertação de Mestrado

Dissertação de mestrado submetida à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (USP). para obter o grau de mestre.
Área de concentração: Tecnologia Químico-Farmacêutico

São Paulo-SP

2012

João Vitor Dutra Molino

Extração de Adenovírus em Sistemas Micelares de Duas Fases Aquosas

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior
orientador/presidente

_____
1º. examinador

_____
2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

DEDICATÓRIA

Dedico essa dissertação aos meus pais, pelo apoio, incentivo e compreensão em todos esses anos. Ao meu irmão, Luiz Henrique Dutra Molino, por todos os momentos convividos em nossas vidas.

À minha grande família, pela alegria nos poucos momentos que estivemos reunidos nos últimos anos.

Aos novos integrantes da minha família, que sempre me ajudaram durante essa fase, Cláudio, Luzia e Carine.

E por último agradeço e agradeço muito à Caroline. Obrigado pelo o "sim", pelos "nãos" e por ficar brava, alegre, triste e feliz

sempre perto de mim.

Merci.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Adalberto Pessoa Junior, pelo apoio, dedicação e oportunidades durante esses dois anos. Aprendi muito nesse período, com sua ajuda e conselhos.

À Professora Priscila Gava Mazzola, pela ajuda, conselhos e exemplos sempre dados prontamente nas diversas vezes em que precisei. É sempre bom ter um modelo de pessoa e sou afortunado de tê-la como um em minha vida.

À Professora Doutora Maria Silvia Viccari Gatti. Por todos os conselhos e tempo dedicado em me ajudar. Durante todo esse tempo eu pensei em como tinha sorte de conhecer uma professora como a senhora. Sua dedicação ao ensino e a sua integridade me inspiram e obrigam a tentar, ao máximo, a ser melhor como pessoa e como educador quando a oportunidade se apresentar diante de mim.

À Professora Carlota de Oliveira Rangel Yagui, pelas discussões e informações que muito contribuíram para meu crescimento.

Aos Professores do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.

Aos funcionários da FBT, em especial à Mirian e Elza.

Aos funcionários colegas de laboratório Luiz, Alex, Cris e, especialmente, à Ana pela ajuda e dedicação.

Aos colegas e amigos pós-doutorandos e pós-graduandos André, Angela, Dani, Joás, Bruno, Leticia, Valéria, Paulo, Cesar e Valker.

À Michele Guescini, Davide Sisti e Renato Panebianco pela colaboração nos estudos de PCRq, mesmo que à distância. Fico feliz de saber que mesmo grupos de outros países conseguem colaborar sem impedimentos. *Grazie mille*.

À Carine de Godoi Rezende Costa e à Professora Joyce Bevilacqua pela ajuda com a parte matemática e computacional, que foram fundamentais nessa etapa do trabalho.

RESUMO

Processos biotecnológicos dependem significativamente das técnicas de separação e purificação utilizadas, para manter boa relação custo-benefício na produção em escala industrial de produtos biotecnológicos com fins comerciais, industriais e terapêuticos. A aplicação do sistema micelar de duas fases aquosas (SMDFA) é proposta como alternativa para purificação de biomoléculas/biopartículas, pois permite sua separação e análise, muitas vezes sem que essas percam sua atividade ou propriedades desejadas. Com essa técnica é possível realizar uma partição seletiva que possibilita altos rendimentos. Esse trabalho destinou-se a estudar o emprego dessa metodologia na extração e purificação de Adenovírus em sistema micelar de duas fases aquosas formado por Triton X-114/Suspensão viral. Os ensaios foram realizados em sistemas de 5 g seguindo um planejamento fatorial completo (2^3) com 4 pontos centrais. Os fatores estudados foram temperatura de extração, pH da suspensão viral e concentração do tensoativo. Sistemas contendo massas de 3g, 10g e 40g foram avaliados. Foi avaliado o efeito do processo de extração com SMDFA sobre a integridade e infectividade de Adenovírus. Alguns dos parâmetros avaliados no processo foram a recuperação da potência viral (R_{Pv}) e a recuperação da potência viral específica ($R_{Pv\varphi}$). Esses dois parâmetros avaliam a inativação do Adenovirus pelo processo de extração e ambos apresentaram melhoras quando comparados com a própria suspensão viral para alguns dos sistemas estudados (i.e R_{Pv}:341 % e $R_{Pv\varphi}$ 1466 %). Esses resultados indicam que o SMDFA foi capaz de particionar seletivamente as partículas virais infecciosas. De acordo com os resultados do planejamento é possível aumentar ainda mais esses resultados controlando as variáveis concentração de tensoativo, pH da suspensão viral e temperatura de extração.

Palavras-chave: Extração líquido-líquido. Adenovirus. Sistema micelar de duas fases aquosas. Biopartículas.

ABSTRACT

Biotechnological processes depend significantly on separation and purification techniques used to maintain cost-effective industrial-scale production of biotechnological products for commercial, industrial and therapeutic uses. The application of the aqueous two-phase micelar system (ATPMS) is proposed as an alternative for purification, since it allows the separation and analysis of biomolecules /bioparticles, often without loses of activity or their properties. This allows to perform a selective partition that enables high yields. This work aims to study the use of this methodology in the extraction and purification of adenovirus in micelle aqueous two-phase formed by TritonX-114/Viral suspension. All assays were performed in 5 g systems following a full factorial design (2^3) with four central points. The studied factors were extraction temperature, pH of the viral suspension and concentration of the surfactant. Systems containing masses of 3g, 10g and 40g were evaluated. Extraction procedure effects over integrity and infectivity of adenovirus were also evaluated. Some of the parameters evaluated in the viral recovery process were viral potency (R_{Pv}) and recovery of viral specific potency ($R_{Pv\varphi}$). These two parameters measure the inactivation of Adenovirus by the extraction process and both showed improvement when compared with the viral suspension for some of the systems studied (i.e RPv: 341% and RPvφ 1466%). These results show that ATPMS selectively partition the infectious viral particles. According to the results of the experimental design is possible to increase, even further, these results controlling the surfactant concentration, viral suspension pH and temperature of extraction.

Keywords: liquid-liquid extraction. Adenovirus. Aqueous two phase micellar system.

LISTA DE FIGURAS:

Figura 1 - Representações esquemáticas de adenovírus. 20
Figura 2: Representação esquemática de sistema micelar de duas fases aquosas (SMDFA) composto de tensoativo. 21
Figura 3: Diagrama de fases de um SMDFA formado com Triton X-114, demonstrando a região bifásica e região monofásica. 22
Figura 4: Representação esquemática das regiões amplificadas nas reações de PCR. 25
Figura 5: Esquema ilustrativo do planejamento fatorial 2^3 com 4 pontos centrais. 27
Figura 6: Esquema representativo da placa do teste de infectividade. 29
Figura 7: Ponto de névoa de um sistema micelar composto de suspensão viral e Triton X-114. 30
Figura 8: Exemplo de modelagem da reação de PCR utilizando a equação de Richard. 36
Figura 9: Esquema de placa de 96 poços demonstrando poços utilizados.....41
Figura 10: Foto exemplo de infecção com inicio da formação de agregados celulares. 43
Figura 11: Foto exemplo de ECP intenso do adenovirus em células HEK-293. 44
Figura 12: Foto exemplo de uma monocamada de células HEK-293 controle. .44
Figura 13: Diagrama de Fases dos sistemas micelares.....45
Figura 14: Exemplo de sistemas formados por suspensão viral e TX-114. 46
Figura 15: Exemplo de Curva ΔRn vs número do ciclo. 50
Figura 16: Exemplo de curva de dissociação de fitas de DNA. 50
Figura 17: Resultado de curva de dissociação obtido com reações com os iniciadores nehex AA1893 e nehex AA1905 com o DNA do adenovirus. 51
Figura 18: Monocamada de células Hep-2 com tampão McIlvaine em pH 5. 52
Figura 19: Monocamada de células Hep-2 com tampão McIlvaine em pH 6. 52
Figura 20: Monocamada de células Hep-2 com tampão McIlvaine em pH 7. 53
Figura 21: Monocamada de células Hep-2 com Triton X-114 em concentração de 0,05%. 53
Figura 22: Monocamada de células Hep-2 com Triton X-114 em concentração de 16% em MEM. 54
Figura 23: Gráfico de Pareto de efeitos padronizados; Variável: K_a.....57
Figura 24: Superfície de resposta para K_a dos fatores pH e temperatura (°C) a 6 % de [Triton X-114]. 58
Figura 25: Gráfico de Pareto de efeitos padronizados; Variável: C_a.....60
Figura 26: Gráfico de Pareto de efeitos padronizados; Variável: $Y_a F_c$ (%). 61
Figura 27: Superfície de resposta para Y_a F_c (%) com os parâmetros pH e temperatura (°C). 62
Figura 28: Gráfico de Pareto de efeitos padronizados; Variável R_{Pv} (%). 64
Figura 29: Gráfico de Pareto de efeitos padronizados; Variável: $R_{Pv\phi}$ (%).....66
Figura 30: Gráfico de Pareto de efeitos padronizados; Variável C_a.....69
Figura 31: Gráfico de Pareto de efeitos padronizados; Variável: Y_aF_c. 71
Figura 32: Fotos exemplo de precipitado na interfase. 72
Figura 33: Gráfico de Pareto de efeitos padronizados; Variável: Y_p (%). 73
Figura 34: Gráfico de Pareto de efeitos padronizados; Variável: F_p.....74
Figura 35: Y_a F_d (%) versus volume. 76
Figura 36: Gráficos de Pareto de efeitos padronizados; Variável: C_a.....80

Figura 37: Gráficos de Pareto de efeitos padronizados; Variável $R_{P\nu\varphi}$ 81

LISTA DE TABELAS:

Tabela 1: Planejamento Fatorial 2^3. 27
Tabela 2: Condições da reação de inserção do fragmento de DNA do Adenovirus no plasmídeo comercial. 33
Tabela 3: Condições da reação de digestão por Proteinase K. 34
Tabela 4: Valores de quantificação por NanoDrop ® do produto do PCR extraído (ng/µL) e da relação de absorbância em 260 e 280 nm. 47
Tabela 5: Quantificação do DNA plasmidial extraído de *E. coli* transformada. .47
Tabela 6: Massa molar e comprimento em pares de base do plasmídeo comercial, *amplicon* e plasmídeo modificado com as sequências do Adenovirus. 48
Tabela 7: Resultados do Planejamento 1, calculado pelo método C_t. 56
Tabela 8: Análise de variância (ANOVA) do K_a. 58
Tabela 9: Análise de variância (ANOVA) dos efeitos no parâmetro C_a do Adenovirus no SMDFA. 60
Tabela 10: pI teórico das principais proteínas do capsídeo viral. 62
Tabela 11: Análise de variância (ANOVA) dos efeitos no parâmetro $Y_a F_c$ (%) do Adenovirus em SMDFA. 63
Tabela 12: Análise de variância (ANOVA) dos efeitos no parâmetro R_{Pv} (%) do Adenovirus no SMDFA. 65
Tabela 13: Análise de variância (ANOVA) dos efeitos no parâmetro $R_{Pv\phi}$ (%) do Adenovirus em SMDFA. 66
Tabela 14: Resultados do Planejamento 2, calculados pelo método de C_t.....68
Tabela 15: Análise de variância (ANOVA) dos efeitos no paramentro C_a do Adenovirus no SMDFA. 70
Tabela 16: Análise de variância (ANOVA) dos efeitos do parâmetro Y_aF_c do Adenovirus no SMDFA. 71
Tabela 17: Análise de Variância (ANOVA) dos efeitos no parâmetro Y_p (%) do Adenovirus no SMDFA. 73
Tabela 18: Análise de variância (ANOVA) do F_p. 75
Tabela 19: Resultados do aumento de escala. 76
Tabela 20: Resultado de desvio padrões relativo para diferentes parâmetros calculados pelos métodos de C_t e de Cy0, Planejamento 1.....78
Tabela 21: Resultados de desvio padrões relativo para diferentes parâmetros calculados pelos métodos de C_t e de Cy0, Planejamento 2.....78
Tabela 22: Resultados do Planejamento 1, calculados pelo método Cy0. 79
Tabela 23: Análise de variância (ANOVA) do C_a calculado com resultados do método Cy0. 81
Tabela 24: Análise de variância (ANOVA) da Recuperação da potência específica ($R_{Pv\phi}$), calculada com resultados do método Cy0. 82
Tabela 25: Resultados do Planejamento 2, calculados pelo método Cy0. 83

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 14
2. REVISÃO DA LITERATURA 16
2.1. EXTRAÇÃO/CONCENTRAÇÃO DE BIOPRODUTOS EM SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS (SDFA) 16
2.2. EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DE VÍRUS 17
2.3. VÍRUS 17
2.4. ADENOVÍRUS 18
2.5. SISTEMAS MICELARES DE DUAS FASES AQUOSAS (SMDFA) 20

3. OBJETIVO 24
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 24

4. MATERIAL E MÉTODOS 25
4.1. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 26
4.1.1. Planejamento Fatorial Completo com Pontos Centrais 26
4.2. CULTURA DE CÉLULAS 28
4.2.1. Obtenção de vírions de Adenovírus Humano Tipo – 5 28
4.2.2. Teste de infectividade viral em placas de 96 poços 28
4.3. DETERMINAÇÃO DAS CURVAS BINODAIS (OU DE COEXISTÊNCIA) - SISTEMAS MICELARES 30
4.3.1. Remoção das fases 31
4.4. CLONAGEM 31
4.4.1. Produção de amplicons 31
4.4.2. Extração dos amplicons 32
4.4.3. Quantificação dos amplicons extraídos 32
4.4.4. Inserção dos amplicons no plasmídeo comercial 33
4.4.5. Transformação de Escherichia coli 33
4.4.6. Seleção de bactérias transformadas 33
4.4.7. Extração de plasmídeo 34
4.5. EXTRAÇÃO DO DNA ADENOVIRAL PARA REAÇÕES DE PCRQ 34
4.6. METODOLOGIAS ANALÍTICAS 35
4.6.1. PCRq, método de Ct 35
4.6.2. PCRq, Método Cy0 35
4.6.3. Teste de infectividade baseado em PCRq 37
4.6.4. Quantificação de proteínas totais 38
4.7. PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO DO SISTEMA 38

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES 43
5.1. OBTENÇÃO DO VÍRUS 43
5.2. DIAGRAMA DE FASES 45
5.3. PRODUÇÃO DO PLASMÍDEO 46
5.4. QUANTIFICAÇÃO DO PLASMÍDEO EM NANODROP® 47
5.5. LIMITAÇÕES NAS TÉCNICAS ANALÍTICAS 49
5.5.1. PCR quantitativo 49
5.5.2. Interferência dos componentes do sistema no teste de infectividade 51

5.6. ANÁLISE DO PLANEJAMENTO FATORIAL COM PONTOS CENTRAIS. 54

5.6.1. Análise estatística – Planejamento 1 55

5.6.1.1. Coeficiente de partição Ka 57
5.6.1.2. Fator de concentração - C_a 59
5.6.1.3. Rendimento da recuperação do Adenovirus na fase concentrada em micelas - Ya F_c (%) 61
5.6.1.4. Rendimento da recuperação da potência viral - RPv (%) 63
5.6.1.5. Recuperação da potência viral específica - $R_{Pv\varphi}$ (%) 65

5.6.2. Análise estatística – Planejamento 2 67

5.6.2.1. Fator de concentração - C_a 69
5.6.2.2. Rendimento de recuperação de Adenovírus na fase concentrada em micelas - Y_a F_c 70
5.6.2.3. Rendimento de recuperação de proteínas totais - $Y_{p\ (\%)}$ 72
5.6.2.4. Fator de purificação - Fp 74

5.7. AUMENTO DE ESCALA 75
5.8. COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS C_T E CY0 DE QUANTIFICAÇÃO POR PCRQ..... 77

5.8.1. Análise estatística – Planejamento 1, calculado com o método Cy0..... 78

5.8.1.1. Fator de concentração - Ca..... 80
5.8.1.2. Recuperação da potência viral específica - RPvφ (%) 81

5.8.2. Análise estatística – Planejamento 2, calculado com o método Cy0..... 82

6. CONCLUSÃO 84
7. REFERÊNCIAS..... 86
8. APENDICE 90

8.1. PROGRAMA PARA CÁLCULO DO CY0 90

1. INTRODUÇÃO

O mercado farmacêutico mundial deve atingir US$ 1,3 bilhão de dólares em 2020 (MORRIS, 2008). Neste mercado, o desenvolvimento de moléculas pequenas vem diminuindo e as vendas de todos os produtos de origem biológica totalizaram 94 milhões de dólares em 2007 e representou o segmento de mais rápido crescimento da indústria farmacêutica. A venda de proteínas recombinantes terapêuticas registrou um total global de US$ 61 bilhões em 2009, sendo que produtos baseados em anticorpos monoclonais atingiram um adicional de US$ 38 bilhões, gerando um valor de mercado total em 2009 de produtos biofarmacêuticos da ordem de US$ 99 bilhões. Biofármacos aprovados para comercialização têm melhorado bastante o tratamento de muitos grupos de doenças, tais como: câncer, diabetes, distúrbios do crescimento, hemofilia e hepatite (WALSH, 2010).

Os processos de produção desses biofármacos atingiram grandes avanços, aumentando a produtividade e o rendimento, com a utilização de meios de cultivo melhorados e estratégias inovadoras de condução do processo (BROWNE; AL-RUBEAI, 2009; DUROCHER; BUTLER, 2009). Os processos de purificação, no entanto, têm sido negligenciados causando um gargalo na produção de biofármacos. Essa mudança está levando a uma inversão no custo das etapas, tornando os processos de purificação a etapa custo limitante (LIU, C.; DOWNEY, 2009). Apesar da possibilidade de aumentar a escala das plataformas de purificação atuais (por exemplo, usando colunas de cromatografia maiores e filtros), essa abordagem irá alcançar seu limite físico em algum ponto no futuro (GOTTSCHALK, 2008; TREXLER-SCHMIDT *et al.*, 2009). A necessidade de desenvolver processos de separação e purificação mais eficiente e de baixo custo é, portanto, essencial para melhorar a eficiência do processo e os aspectos econômicos mantendo os padrões exigidos de qualidade para aprovação do mercado (ROSA *et al.*, 2010).

Para que as inovações em purificação se equiparem àquelas obtidas nos processos de bioconversão, os estudos de técnicas de purificação devem objetivar aumento de resolução, simplicidade, rapidez, facilidade de ampliação de escala e a possibilidade de operação em sistema contínuo. Dentro deste contexto está inserida a extração líquido-líquido de biomoléculas em diferentes sistemas, tais como: (i) sistemas poliméricos; (ii) sistemas micelares e, (iii) sistemas micelares reversos.

O processo de separação pela extração líquido-líquido (ELL) é um dos principais procedimentos empregados na indústria, dado sua simplicidade, custos baixos e facilidade de ampliação de escala. O processo convencional envolve a transferência de massa (um soluto) entre dois líquidos imiscíveis, ou parcialmente miscíveis, geralmente um solvente aquoso e outro solvente orgânico. Nos últimos anos vêm se ampliando os estudos de ELL com a utilização de fluidos complexos em processos de extração de biomoléculas. Para tanto, propõe-se a adição de tensoativos ou copolímeros às soluções aquosas (sistemas micelares aquosos bifásicos), ou ainda a utilização de microemulsões de tensoativos em solventes orgânicos (sistemas micelares reversos) (HASMANN *et al.*, 2007; RANGEL-YAGUI *et al.*, 2003; VENTURA *et al.*, 2012).

Em contraste com sistemas orgânico-aquosos convencionais, o sistema de duas fases aquosas (SDFA) forma um ambiente ameno para biomoléculas, pois a massa de ambas as fases são constituídas principalmente de água e a maioria dos agentes formadores de fases tem efeito estabilizante na estrutura terciária de proteínas e na atividade biológica (ALBERTSSON, P. A *et al.*, 1987; DREYER; KRAGL, 2008; FERNANDES, SHERYL *et al.*, 2002; HATTI-KAUL, R, 2000).

A extração destas biomoléculas depende principalmente de suas propriedades físico-químicas, tais como ponto isoelétrico, hidrofobicidade, massa molar etc; mas também das propriedades das fases, como tipo e concentração de polímero ou tensoativo, pH, tipo e concentração de sais presentes, entre outras (HAMMAR, 1994; NORRBY; ALBERTSSON, P. A, 1960; PHILIPSON; ALBERTSSON, P. *et al.*, 1960).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. EXTRAÇÃO/CONCENTRAÇÃO DE BIOPRODUTOS EM SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS (SDFA)

Produtos derivados de processos biotecnológicos são geralmente obtidos de forma diluída e a partir de meios complexos contendo contaminantes diversos, tais como: células, componentes celulares, proteínas contaminantes, componentes do meio de cultura, pigmentos, polissacarídeos etc. Tais contaminantes podem diminuir a atividade biológica de uma molécula, ou até mesmo inviabilizá-la no momento da utilização (HUSTEDT *et al.*, 1985; PLATIS; LABROU, 2006).

O sistema de duas fases aquosas, SDFA, vem sendo utilizado como uma ferramenta para a separação de biomateriais, tendo sido testado com sucesso para a extração e purificação de proteínas (PLATIS; LABROU, 2006), biopartículas (vírus) e células intactas (GARCÍA-PÉREZ *et al.*, 1998), partículas *virus-like* (BENAVIDES *et al.*, 2006; LUECHAU *et al.*, 2011), corpos de inclusão (WALKER, SIMON G; LYDDIATT, ANDREW, 1999), DNA-plasmidial (JOHANSSON, H.-O. *et al.*, 2012; LUECHAU *et al.*, 2009; RIBEIRO *et al.*, 2002; TRINDADE *et al.*, 2005), substitutos mímicos de vetores virais e vetores adenovirais (BRAAS, G. M. F.; WALKER, S G; *et al.*, 2000), além de compostos inorgânicos produzidos por microrganismos (RITO-PALOMARES *et al.*, 2001) (Rito-Palomares, Negrete *et al.*, 2001).

O princípio do método de separação em um sistema de duas fases é a distribuição seletiva das substâncias entre elas (FERNANDES, S *et al.*, 2001). Essa distribuição é governada por uma gama de parâmetros relacionados com as propriedades das fases do sistema e das substâncias e a interação entre as duas (ALBERTSSON, P. A *et al.*, 1987; HASMANN *et al.*, 2007). Contudo, a partição pode ser feita seletivamente por manipulação das propriedades do sistema, de forma a tornar uma determinada interação predominante. A grande variedade de fatores contribuindo para partição torna o sistema muito versátil, em comparação com técnicas de separação como centrifugação, eletroforese e outras, permitindo o fracionamento de espécies moleculares e particuladas diferindo muito pouco uma da outra (HASMANN *et al.*, 2007).

2.2. EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DE VÍRUS

O método de extração líquido-líquido para separar compostos é baseado nas diferentes interações entre os solutos e líquidos imiscíveis, usualmente água e um solvente orgânico. Isso faz com que uma substância ou mais sejam extraídas de uma fase para a outra, ou mesmo, que seja retida na interfase desses dois líquidos. Um tipo de extração líquido-líquido é o sistema de duas fases aquosas (SDFA). Na extração de vírus o SDFA vem sendo utilizado em diversos estudos (KAMEI, DANIEL T *et al.*, 2002; PHILIPSON; ALBERTSSON, P. Å. *et al.*, 1960; SCHLOER; BREESE, 1982; WALTER *et al.*, 1985). A extração de vírus e de outras partículas em SDFA surge como um método mais atrativo para a sua recuperação e para a produção de produtos biotecnológicos, considerando sua capacidade de aumento de escala e potencial de purificação e concentração de vírus (HATTI-KAUL, R, 2000).

O método de ultracentrifugação em gradiente de densidade é um método eficiente para a concentração e purificação de partículas virais de fluídos de culturas. Contudo, por vezes, apresenta baixo rendimento na recuperação de partículas infecciosas, já que pode levar a perdas de componentes necessários à adsorção dos vírions às células. O SDFA permite extração em condições menos danosas para vírions (HATTI-KAUL, R, 2000).

O SDFA já foi utilizado para fins práticos como, por exemplo, na preparação de vacina para o vírus da febre aftosa. Também foi utilizado para a purificação de vírus da encefalite equina venezuelana (VEE), em que uma alta pureza foi obtida num processo de extração em três etapas, sendo que os vírus foram alternadamente particionados para a fase superior e inferior do sistema. Um procedimento parecido foi discutido por Philipson *et al*. (PHILIPSON; ALBERTSSON, P. Å. *et al.*, 1960) e Norrby e Albertsson (NORRBY; ALBERTSSON, P. A, 1960).

2.3. VÍRUS

Vírus são parasitas intracelulares obrigatórios e precisam, portanto, de uma célula hospedeira para completar seu ciclo. Existe uma grande variedade de vírus, quanto à forma, conteúdo genômico, arranjo estrutural, infectividade, tipo de replicação e outras características. Em uma definição básica, tem-se que vírus são

compostos de um genoma e uma ou mais proteínas cobrindo esse genoma. A informação genética para tais proteínas que envolvem o genoma e outras informações necessárias para a replicação do vírus estão parcial ou totalmente codificadas nesse genoma (FIELDS *et al.*, 1996).

A multiplicação viral ocorre basicamente a partir da interação específica de estruturas virais com a superfície da célula hospedeira, em que o genoma viral vai ou não até o núcleo. A expressão desse genoma nas células, por mecanismos celulares e/ou virais, levará à replicação do ácido nucléico viral e à síntese de proteínas virais. Novas proteínas estruturais virais irão se agregar, formando o capsídeo viral no qual o genoma viral é incluído. Os vírus assim formados, ou seja, a progênie viral é liberada e assim pode repetir o processo de multiplicação em novas células hospedeiras (WAGNER, 2008).

A terapia gênica vem sendo estudada como alternativa para alguns procedimentos clínicos convencionais. Na teoria, com essa técnica seria possível curar ou tratar desordens como fibrose cística, doenças cardiovasculares, doenças autoimunes e alguns tipos de câncer (FLOTTE, 2007). A terapia gênica necessita de um sistema de transporte de material genético. Alguns vírus podem ser utilizados com essa finalidade, devido sua capacidade de inserir material genético externo em células hospedeiras. Outra característica é a capacidade de seletividade desses vetores, que vem sendo estudada de forma a ser direcionada ao alvo terapêutico (WAEHLER *et al.*, 2007).

2.4. ADENOVÍRUS

Adenovírus são vírus de DNA dupla fita, descritos inicialmente por Rowe e colaboradores (ROWE *et al.*, 1953) enquanto estavam tentando cultivar tecido adenóide no laboratório. Esses vírus foram então estudados sobretudo como modelo para processos básicos celulares de eucariotos como a transcrição, processamento de RNA, replicação de DNA e tradução (LANGLAND *et al.*, 2006).

Adenovírus (Ad) são vírus não envelopados, compostos de um capsídeo icosaédrico, de 70-90nm de diâmetro com uma proteína externa envolvendo nucleoproteínas mais internas (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**). O capsídeo dos Ad consiste em 252 subunidades chamadas capsômeros, 240

proteínas *hexons* e 12 bases pentâmeras. Além dessas, o capsídeo possui outras proteínas tais como pIIIa, pVI, pVIII e pIX (MAJHEN *et al.*, 2006). Ad possuem 12 vértices no capsídeo os quais têm uma base *penton* rodeada por cinco *hexons*. A base *penton* age como âncora para a proteína em fibra que sai do vírus como uma antena. Essa proteína em fibra é um homotrímero no qual três polipeptídios são orientados em paralelo (STOUTEN *et al.*, 1992) e possuem três domínios, funcional e estruturalmente diferentes: um N-terminal, que liga não covalentemente a fibra ao pentâmero base, um C-terminal que forma uma saliência (*knob*) similar a uma hélice (XIA *et al.*, 1994) e responsável pela ligação com o receptor, e uma em forma de haste, cujo comprimento depende do sorotipo do vírus (GREEM *et al.*, 1983).

A montagem das partículas virais no núcleo de uma célula infectada por adenovírus começa por volta de 8 horas após infecção e resulta na produção de uma progênie de 10^4-10^5 partículas por célula, as quais são liberadas por lise celular como partículas maduras 30-40 horas depois da infecção (FIELDS *et al.*, 1996).

Os vírus são transportadores de ácidos nucléicos naturais, tanto para DNA quanto para RNA, dependendo do vírus. Muitas vezes, alguns vírus conseguem inserir esse material nucléico eficientemente em células hospedeiras (KUBO *et al.*, 2011). Adenovírus apresentam algumas características que os tornam um potencial vetor para a entrega de genes (*gene delivery*) em células eucarióticas. Ad recombinantes podem ser produzidos em altas concentrações, têm relativamente alta capacidade para inserção de transgenes tanto em células quiescentes quanto naquelas em divisão, sem incorporação do DNA viral no cromossomo do hospedeiro. Após a infecção, a expressão de transgenes é eficiente em curtos períodos, de semanas a meses. Essa característica direciona a aplicação desse tipo de vetor para o tratamento de câncer, por exemplo. Por ser um vírus em que o material genético não é acoplado a um cromossomo não possui o risco de ativar oncogenes (MAJHEN *et al.*, 2006).

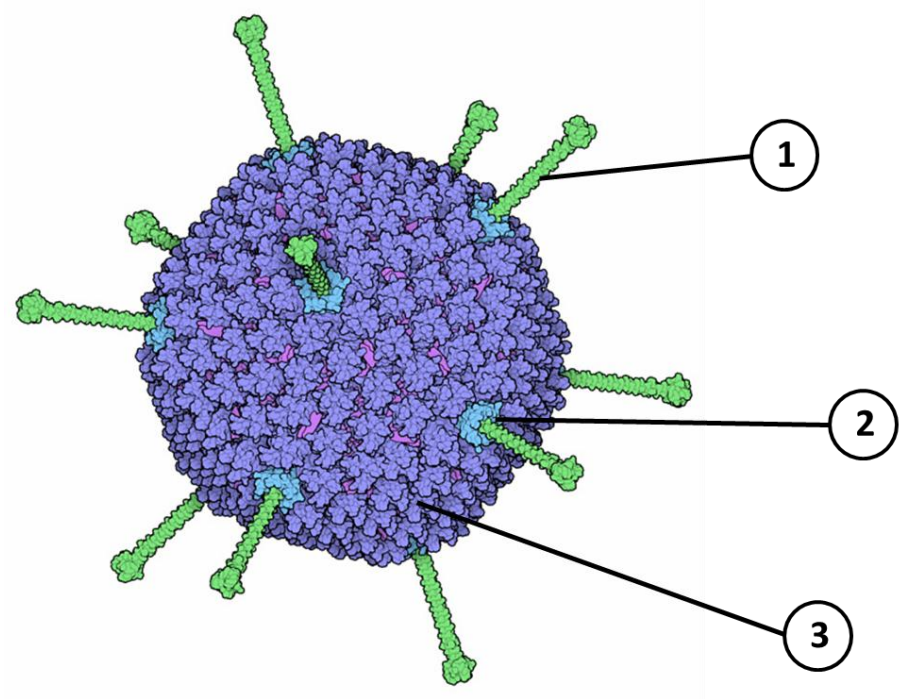

Figura 1 - Representações esquemáticas de adenovírus.
Fonte: RCSB – PDB (www.pdb.org)
Fibra (1), capsômeros penton (2) e capsômeros hexons (3).

Vetores virais para terapia gênica em câncer devem ser idealmente seletivos para os tecidos em que a entrega do gene é desejada, limitando desse modo a toxicidade para as células vizinhas. Atualmente, aproximadamente 2/3 de todos os testes clínicos com terapia gênica são voltados para o tratamento de câncer e aproximadamente 24% de todos os testes clínicos em terapia gênica utilizam vetor adenoviral, seguido pelos vetores retrovirais, com aproximadamente 21% (EDELSTEIN, 2012).

2.5. SISTEMAS MICELARES DE DUAS FASES AQUOSAS (SMDFA)

Na formação dos sistemas micelares de duas fases aquosas empregam-se agentes de superfície (tensoativo), os quais consistem de moléculas anfifílicas que possuem uma porção não polar e outra polar. Os tensoativos podem ser classificados em três classes gerais: (i) iônicos, que possuem cabeça positiva ou negativamente carregada; (ii) não-iônicos, que possuem cabeça polar capaz de realizar ligações de hidrogênio com a água e, (iii) zwiteriônicos, que possuem cabeça caracterizada por um dipolo. Dentre os tensoativos iônicos há os aniônicos

(negativamente carregados), como lauril sulfato de sódio (SDS e AOT) e os catiônicos (positivamente carregados) como o brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB). Triton-X e lecitina de soja são exemplos típicos de tensoativos não iônicos (ou neutros) e zwiteriônicos, respectivamente (MANIASSO, 2001).

Moléculas anfifílicas, acima de uma concentração chamada concentração micelar crítica (CMC), formam, em solução aquosa, aglomerados de moléculas que podem assumir formas e dimensões diferentes, denominadas micelas. Nas micelas, as cabeças hidrofílicas estão localizadas em permanente contato com a água enquanto as caudas hidrofóbicas são mantidas no seu interior sem contato com o solvente e, mesmo após o aparecimento de micelas, continua havendo moléculas anfifílicas dispersas na solução. Se utilizarmos solventes apolares serão formadas as chamadas micelas reversas, onde a cauda fica na parte exterior em contato com o solvente e a cabeça polar no interior. Estas definições descrevem o agregado e seus componentes, porém não deixam claro serem os sistemas micelares estruturas dinâmicas as quais podem alterar os constituintes, incluindo o conteúdo de água, tensoativos e outros (MAZZOLA *et al.*, 2008).

No sistema micelar de duas fases aquosas, uma solução de tensoativos, sob condições apropriadas, separa-se, espontaneamente, em duas fases líquidas predominantemente aquosas, porém imiscíveis (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**).

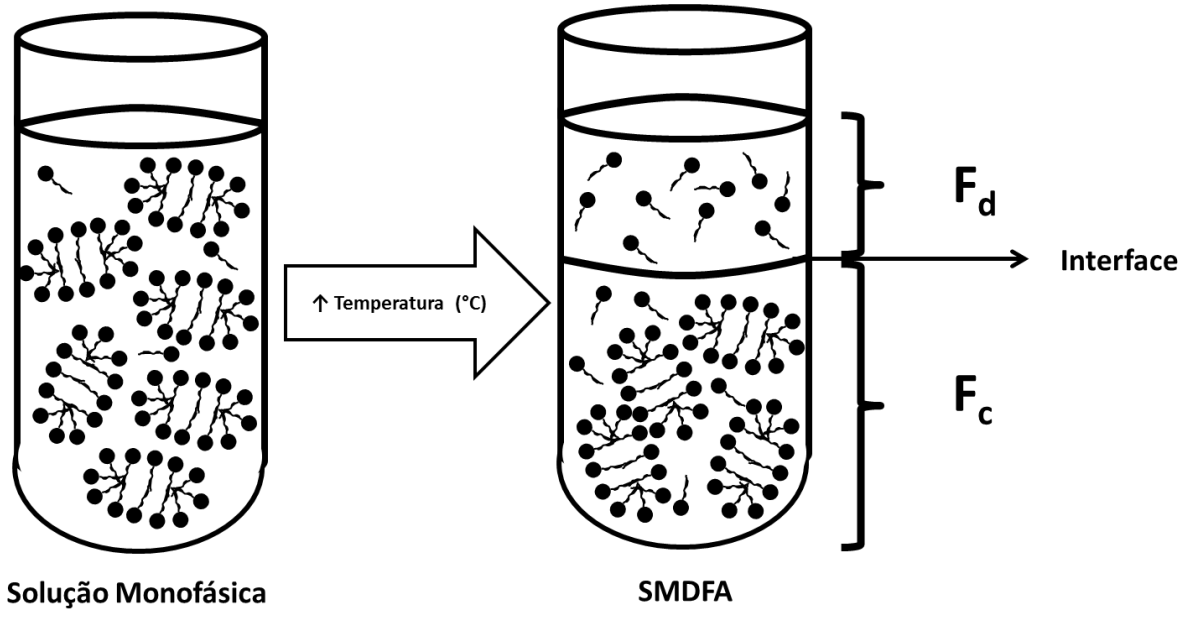

Figura 2: Representação esquemática de sistema micelar de duas fases aquosas (SMDFA) composto de tensoativo.
Fonte: Autor

Fd: Fase pobre em mic elas; Fc: Fase rica em micelas. Solução monofásica composta de tensoativo acima da concentração micelar crítica (CMC).

As condições em que o sistema micelar é formado podem ser observadas em um diagrama de fases (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**). Uma das fases possui maior concentração de micelas que a outra, são denominadas fase rica e pobre em micelas, respectivamente (LIU, C. L. *et al.*, 1998). Alguns fatores influenciam o sistema micelar de duas fases aquosas, como tipo de tensoativo usado na formação das micelas, adição de sais, presença de ligantes de afinidade junto às micelas, pH , temperatura e outros (EVERBERG *et al.*, 2006).

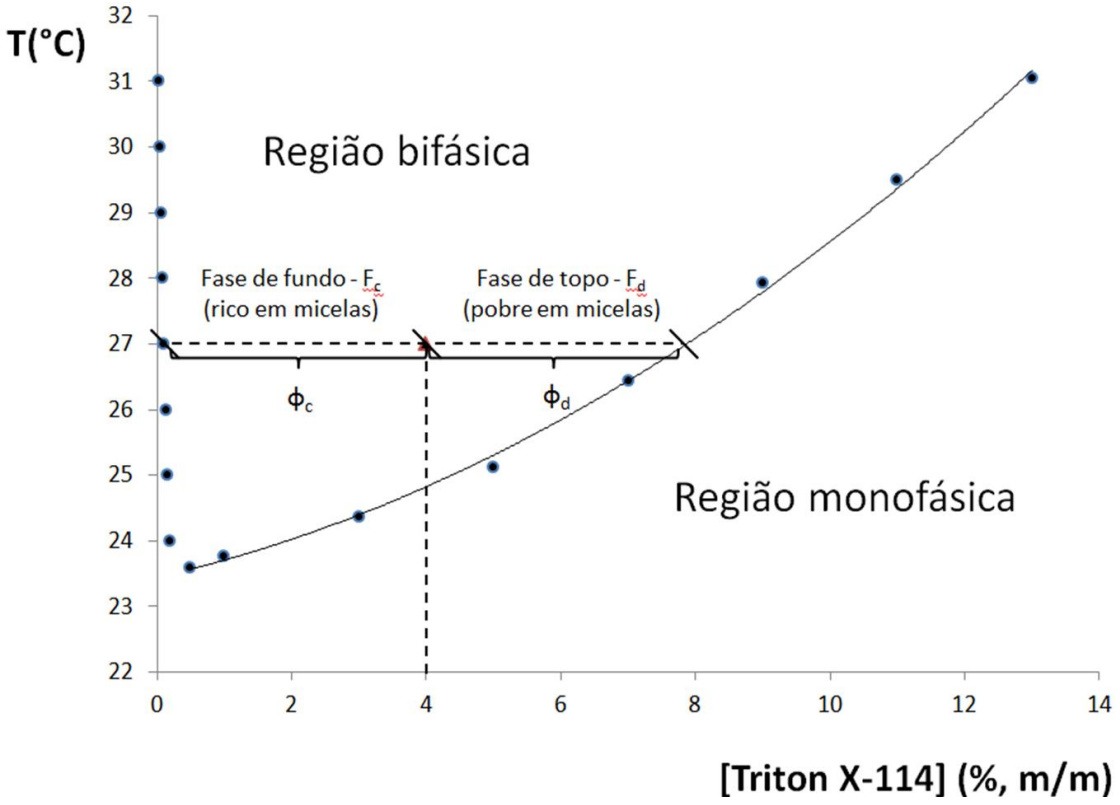

Figura 3: Diagrama de fases de um SMDFA formado com Triton X-114, demonstrando a região bifásica e região monofásica.
Fonte: Autor
A razão volumétrica de um sistema composto por 4% de Triton X-114 a 27°C está indicada pela linha tracejada horizontal. Φ_c e Φ_d representam a porção volumétrica de F_c e F_d, respectivamente, no SMDFA.

A partição de compostos como proteínas é governada primariamente por interações repulsivas, estéricas, por volume de exclusão entre proteínas hidrofílicas globulares e micelas cilíndricas não carregadas, o que conduz as proteínas principalmente para a fase pobre em micela. Porém, a utilização de tensoativos com cabeças carregadas, misturadas com tensoativos não iônicos, possibilita direcionar a

partição dos compostos, dependendo da sua afinidade pelo tensoativo constituinte da micela (LEE; SU, 1999; SAITOH; HINZE, 1995; SIVARS; TJERNELD, FOLKE, 2000).

A variação do pH gera mudança na distribuição de cargas em proteínas e possivelmente em partículas virais. Dependendo do pH essas estruturas podem estar carregadas negativa ou positivamente, ou ainda serem neutras, sendo que no ponto isoelétrico (pI), a somatória das cargas é praticamente nula. Onde a somatória de cargas da proteína é praticamente nula, existirá apenas o efeito do tamanho e concentração do tensoativo e do tamanho e composição da superfície da proteína (FORCINITI *et al.*, 1991).

Para avaliarmos se o SMDFA pode ser aplicado para a extração do adenovírus humano sorotipo 5 (HAdv-5) nós extraímos lisados celulares contendo adenovírus com o sistema utilizando um planejamento fatorial. Essa metodologia nos permitirá avaliar se os fatores estudados (temperatura de extração, pH da suspensão viral e concentração de Triton X-114) são importantes para extração e purificação do adenovírus.

3. OBJETIVO

Avaliar a partição e o rendimento na extração do Adenovírus (Ad) em sistemas micelares de duas fases aquosas.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar efeitos do processo de extração do SDFA sobre a integridade e infectividade dos Adenovírus;
- Estudar o efeito da variação de pH, temperatura, concentração de tensoativo na partição e recuperação de adenovírus em sistemas micelares de duas fases aquosas utilizando planejamento fatorial completo 2^3 com 4 pontos centrais;
- Avaliar a partição viral em sistemas com diferentes volumes para observar efeito da mudança de escala no processo de extração.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O tensoativo Triton X-114 foi adquirido da Sigma-Aldrich. Adenovírus humano sorotipo 5 (HAdv-5) foram obtidos em suspensão a partir do cultivo em células renais embrionárias humanas 293 (HEK-293).

Os iniciadores utilizados para as reações de PCR foram os pares hexAA1885 (5'-GCCGCAGTGGTCTTACATGCACATC-3') e hexAA1913 (5' CAGCACGCCGCGGATGTCAAAGT 3') e o par nehexAA1893 (5' CCACCGAGACGTACTTCAGCCTG 3') nehexAA1905 (5' TGTACGAGTACGCGGTATCCTCGCGGTC 3'). Ambos os pares de iniciadores são codificantes da região da proteína constituinte do capsídeo viral, o hexon (ALLARD *et al.*, 1992). O par de iniciadores "nehex" possui sua sequência no interior da região amplificada pelo outro par de iniciadores, com pode ser observado no esquema abaixo, sendo utilizado para reação de nested-PCR e em testes iniciais com o PCR quantitativo (PCRq) (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**). A reação de nested-PCR, é uma variação da reação de cadeia da polimerase, em que reações consecutivas são realizadas utilizando diferentes pares de iniciadores.

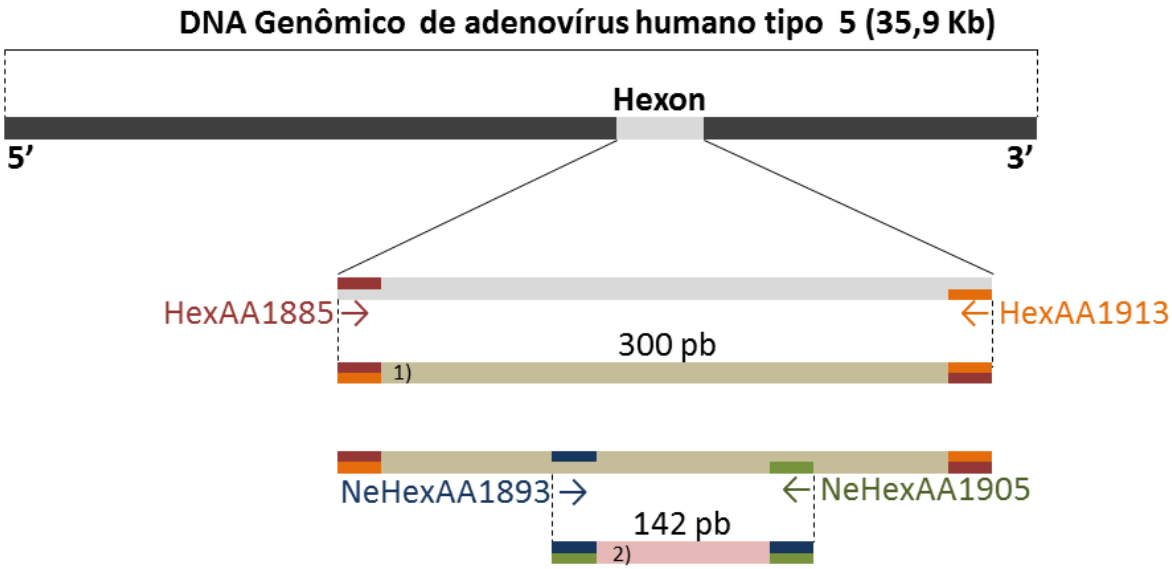

Figura 4: Representação esquemática das regiões amplificadas nas reações de PCR.
Fonte: Autor

A região amplificada é correspondente à região codificadora do hexon no genoma adenoviral. 1) Sequência de 300 pb amplificada pelos pares HexAA1885 e

Hex 1913. 2) Sequência de 142 pb amplificada na região interna da sequência 1, pelo pares de iniciadores NeHexAA1893 e NeHexAA1905. A amostra viral foi gentilmente cedida pela Prof. Dra. Maria Silvia Viccari Gatti, do Instituto de Biologia da UNICAMP (Campinas, SP) que também auxilia no treinamento do mestrando para a obtenção da suspensão viral, quantificação por titulação viral.

4.1. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Estudo da influência das variáveis: temperatura de extração, pH da suspensão viral e concentração do tensoativo Triton X-114 nos parâmetros de avaliação da extração e purificação foi realizado utilizando o planejamento fatorial. Os experimentos foram preparados em tubos de centrífuga de 15mL, acondicionados em banhos com controle de temperatura (±0,01°C). As massas totais dos experimentos foram de 5,00g, a menos que especificado outro valor. As variáveis foram estudadas da forma descrita abaixo.

4.1.1. Planejamento Fatorial Completo com Pontos Centrais

O planejamento fatorial é uma ferramenta estatística que possui diversas aplicações, entre elas, reduz o número de ensaios para estudo de fatores e geralmente indica uma direção promissora para melhorar parâmetros de interesse (BOX *et al.*, 2005). Planejamento fatorial completo 2^3 com quatro pontos centrais foi escolhido para realizar os experimentos. Dois níveis para cada uma das três variáveis (Temperatura de extração, pH da suspensão viral e concentração do tensoativo Triton X-114) foram definidos como apresentados na Tabela 1 e esquematizados na **Erro! Fonte de referência não encontrada.**.

Foram realizados experimentos utilizando tampão McIlvaine, porém o mesmo apresentou interferência na técnica analítica PCRq (Reação em cadeia da polimerase quantitativa) e não foi mais utilizado. A solução adotada foi utilizar a suspensão viral misturada diretamente com o Triton X-114 formando o sistema de micelar de duas fases aquosas. O intervalo das variáveis foi determinado de acordo com a experiência do grupo de pesquisa do Prof. Adalberto Pessoa Jr.

Tabela 1: Planejamento Fatorial 2^3.

Ensaio	Temperatura (°C)	pH	[Triton X-114] (%m/m)	Código
A	33,0	6,0	1,0	-1, -1, -1
B	37,0	6,0	1,0	+1, -1, -1
C	33,0	7,0	1,0	-1, +1, -1
D	37,0	7,0	1,0	+1, +1, -1
E	33,0	6,0	11,0	-1, -1, +1
F	37,0	6,0	11,0	+1, -1, +1
G	33,0	7,0	11,0	-1, +1, +1
H	37,0	7,0	11,0	+1, +1, +1
I	35,0	6,5	6,0	0,0,0
J	35,0	6,5	6,0	0,0,0
K	35,0	6,5	6,0	0,0,0
L	35,0	6,5	6,0	0,0,0

*Coluna código representa os níveis das variáveis, (-1) indicando nível baixo da variável, (+1) indicando nível alto da variável e (0) indicando os níveis centrais.

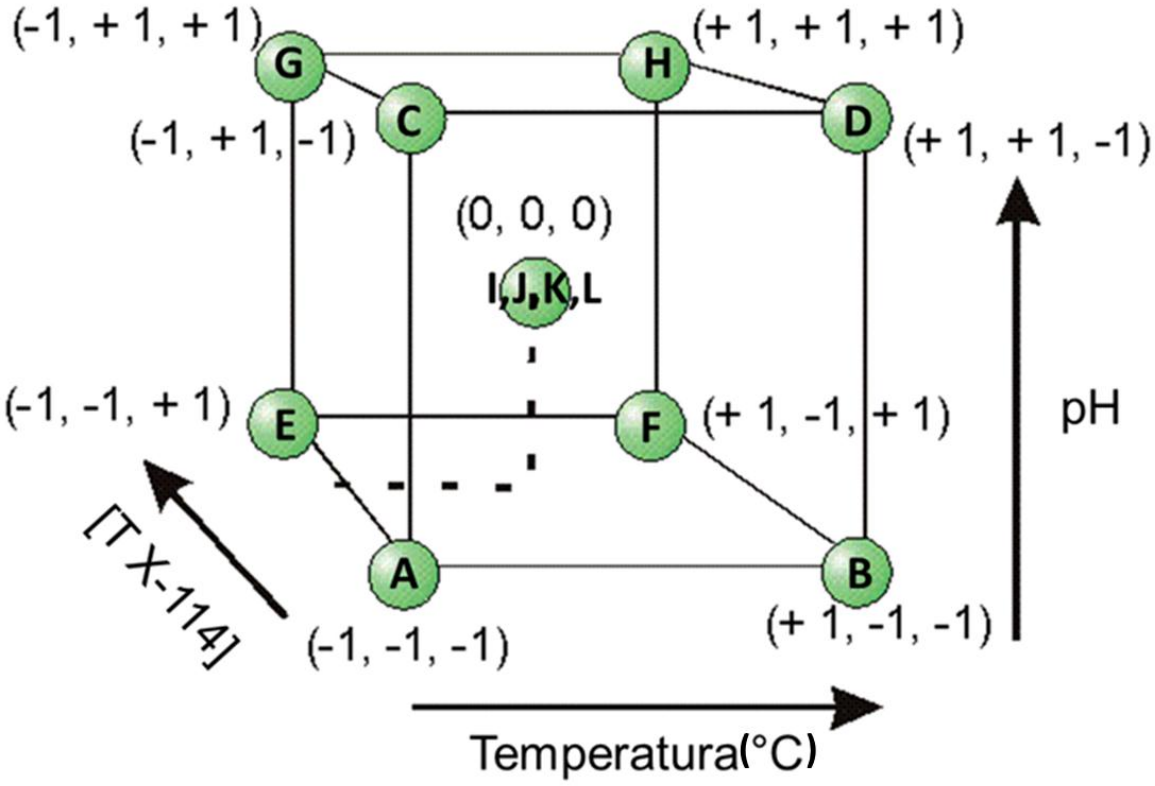

Figura 5: Esquema ilustrativo do planejamento fatorial 2^3 com 4 pontos centrais.
Fonte: Autor
Letras representam os ensaios realizados. Cada aresta do cubo representa a faixa de estudo de uma variável.

4.2. CULTURA DE CÉLULAS

4.2.1. Obtenção de vírions de Adenovírus Humano Tipo – 5

HEK-293 foram utilizadas para a obtenção de adenovírus em suspensão. Adenovírus Humano tipo – 5 (HAdv-5), foram gentilmente cedidos pela Profa. Maria Silvia Gatti do Instituto de Biologia - Unicamp. As células HEK-293 foram cultivadas em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), com 10% de soro fetal bovino (SFB) e solução de antibióticos (penicilina 100 UI/mL e estreptomicina 100 µg/mL), acrescido de 1,1µM de piruvato de sódio em garrafas de 25 cm^2 e de 75 cm^2. Sub-cultivos dessa linhagem celular são obtidos com o uso de solução de tripsina 0,25%, EDTA 0,053M, na proporção de 1:5 (http://www.atcc.org/).

Para o cultivo de adenovírus, células HEK-293 foram incubadas por 48 horas a 37°C, em estufa com 95% de umidade e 5% de CO_2. Monocamada de células cultivadas em garrafas de 75 cm^2 foram pré-incubadas com 30 mL PBS^+ (154 mM NaCl, 5,6 mM, 1mM KH_2PO_4, 90 µM $CaCl_2$ e 49 µM $MgCl_2$) por 15 min, seguido por 30 mL de meio DMEM por 5 min. Foram adicionados 8 mL de suspensão viral em diluições capazes de induzir 100TCID50% (dose infectante capaz de induzir 50% de efeito citopático na monocamada celular) na monocamada celular acondicionada na estufa nas mesmas condições de cultivo celular, agitando levemente a cada 15 min. Após 2h o inoculo foi retirado e foram adicionados à monocamada 50 mL de DMEM, 0,5% SFB e solução de antibióticos, nas mesmas concentrações já indicadas. Após 72 horas da infecção, a monocamada foi observada para a presença de efeito citopático (ECP) típico de adenovírus, ou seja, arredondamento celular, seguido de desprendimento da monocamada. A suspensão viral assim obtida foi congelada e descongelada por três vezes e estocada até o seu uso a -20°C por não mais que um mês.

4.2.2. Teste de infectividade viral em placas de 96 poços

A infectividade viral foi avaliada em placas de 96 poços que foram preparadas adicionando 150 µL de suspenção celular de HEK-293 na concentração de 6,6 x 10^4

células/mL contadas em câmera de Neubauer. A solução foi preparada diluindo as células cultivadas em garrafas de cultivo com meio DMEM, 10% SFB e solução de antibióticos na concentração desejada. As placas foram cultivadas por 24h antes da infecção. O teste de infectividade foi realizado adicionando 50µL de suspenção viral em diluição seriada, com 8 replicatas para cada diluição. As diluições foram realizadas em meio DMEM adicionando 100 µL de suspenção viral em 900µL de meio em microtubos de 1,5mL usando a diluição anterior. A **Erro! Fonte de referência não encontrada.** apresenta um esquema de placa preparada para teste de infectividade.

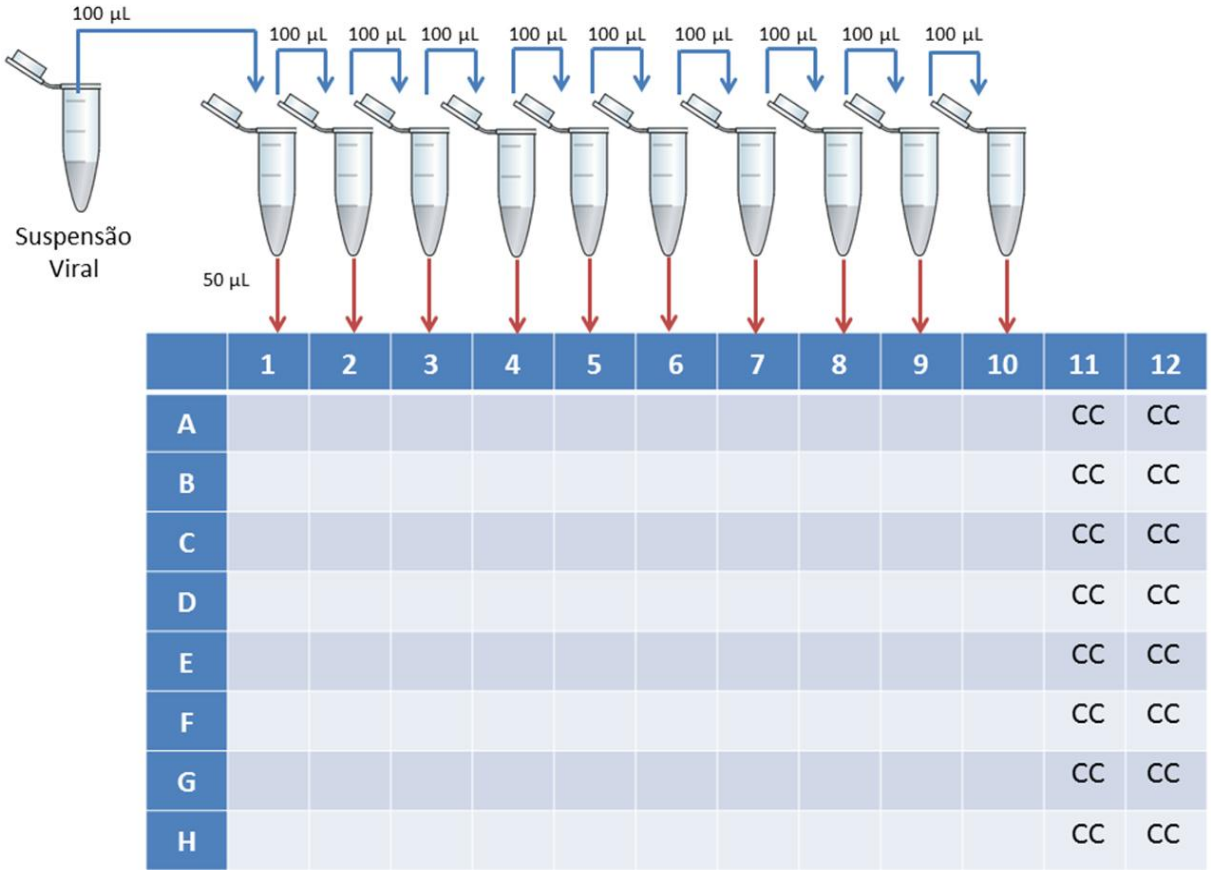

Figura 6: Esquema representativo da placa do teste de infectividade.
Fonte: Autor
100 µL da amostra viral a ser testada são adicionadas a 900 µL de meio DMEM e homogeneizados. A diluição seriada é conduzida utilizando esses volumes e homogeneizações. 50 µL das diluições preparadas foram adicionadas a cada poço correspondente. As colunas 11 e 12 sempre foram utilizadas como controle celular (CC).

Após 72 horas, as placas foram congeladas e descongeladas para lise celular e estocadas até o dia da extração do DNA adenoviral. Para evitar contaminação no processo de extração do DNA de cada poço, um filme adesivo plástico foi colado sobre os poços e a extração foi conduzida inicialmente pelas maiores diluições até

as de menor diluição. Todos os poços foram homogeneizados por pipetagem, puxando e soltando o conteúdo do poço repetidas vezes.

4.3. DETERMINAÇÃO DAS CURVAS BINODAIS (OU DE COEXISTÊNCIA) - SISTEMAS MICELARES

A curva binodal de solução aquosa de suspensão viral e Triton X-114 foi determinada de acordo com o método do "ponto de névoa" descrito (BLANKSCHTEIN, DANIEL *et al.*, 1986). Este método consiste em, visualmente, identificar a temperatura, $T_{névoa}$, na qual soluções com concentrações conhecidas de tensoativo tornam-se turvas à medida que se aumenta a temperatura. Soluções contendo diferentes concentrações de Triton X-114 foram colocadas em um banho transparente termorregulável. Inicialmente cada solução foi resfriada a uma temperatura suficientemente baixa (~12°C) para que o sistema apresentasse uma única fase, clara e homogênea. A partir desse ponto, a temperatura foi lentamente aumentada (de 0,01 em 0,01 ^{o}C) até que a solução se tornasse turva (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**). Esse procedimento foi realizado em triplicata para cada valor de concentração e o ponto de névoa definido como a média dos três valores de temperatura determinados. A curva binodal foi obtida traçando-se os valores de $T_{névoa}$ em função da concentração do tensoativo.

Figura 7: Ponto de névoa de um sistema micelar composto de suspensão viral e Triton X-114.
Fonte: Autor

Foram preparados sistemas micelares com distintas concentrações de tensoativo e suspensão viral em diferentes pH. Os sistemas foram preparados com massa total de 3g. As concentrações de Triton X-114 analisadas foram: 0,5; 1; 3; 5; 7; 9 e 11 % (m/m), os pHs das suspensões virais utilizadas no preparo do SMDFA foram 6, 6,5 e 7.

4.3.1. Remoção das fases

As fases formadas no sistema foram recolhidas metodicamente, de forma a evitar a mistura das duas fases nas amostras obtidas. A fase superior, pobre em micelas, foi recolhida utilizando micropipeta de 1000µL. A fase inferior foi obtida perfurando o tubo plástico dos sistemas com agulha e seringa, recolhendo a maior parte da fase inferior, rica em micelas.

4.4. CLONAGEM

4.4.1. Produção de amplicons

A reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizou sequências de oligonucleotídeos iniciadores sintetizados pela Invitrogen® e foi realizada segundo recomendações de ALLARD *et al.,*(ALLARD *et al.*, 1992). Estes oligonucleotídeos identificam a região conservada que codifica o hexon, comum para todos os sorotipos do gênero *Mastadenovírus*. A primeira amplificação foi realizada utilizando-se o par de iniciadores hexAA1885 e hexAA1913. As reações foram feitas preparando-se uma solução de reagentes (*master mix*) contendo 10mM de tampão de reação, 200µM de cada dNTP (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), 80nM de cada iniciador, 1nM de $MgCl_2$, 2,5 unidades de *Tth*-DNA-polimerase (originária de *Thermus thermophilus*, *Biotools*) (GREEN; LEWIS, G. D., 1995). Para um volume final de solução de 50µL, 5µL de DNA extraído foi acrescido. O primeiro ciclo de desnaturação foi feito durante 4 minutos a 94°C, seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto para o anelamento dos iniciadores e 72°C por 45

segundos para a extensão. Ao final dos ciclos de amplificação, foram programados mais 7 minutos a 72°C para a extensão final das moléculas de DNA amplificadas, seguido de temperatura de resfriamento de 4 °C por tempo indeterminado.

O *nested*-PCR foi realizado nas mesmas condições, usando-se o par de iniciadores nehexAA1893 e nehexAA1905 e adicionando-se à solução de reação 1 µL de *amplicon* da reação descrita anteriormente. O segundo par de iniciadores utilizado deve ser específico para uma região no interior da sequência amplificada da primeira reação

4.4.2. Extração dos amplicons

A amplificação dos fragmentos foi realizada utilizando os pares de iniciadores (*sense* e *anti-sense*) nas condições anteriormente descritas e a confirmação da presença dos produtos foi realizada com uma eletroforese em agarose. O produto da reação de PCR foi extraído adicionando dois volumes de etanol absoluto e 10 % em volume de acetato de sódio 3M, mantendo-os em gelo seco por 30 min. Após esse período foi centrifugado a 15.600 RCF (*Relative Centrifugal Force*) a 4ºC por 30 min. Após remoção do sobrenadante, foi adicionado 1mL de etanol 70ºGL, e os tubos foram submetidos a nova centrifugação nas mesmas condições por 10 min. O sobrenadante foi removido e os tubos foram secos em repouso a temperatura ambiente. O DNA precipitado foi então ressuspendido em 40µL de água ultra pura autoclavada.

4.4.3. Quantificação dos amplicons extraídos

A quantificação dos *amplicons* foi realizada utilizando o NanoDrop® ND-1000 *Spectrophotometer*. Os valores de concentração de ácidos nucléicos foram utilizados para o preparo da reação de inserção do fragmento no plasmídeo comercial. A relação OD 260/280 foi observada para avaliar a eficiência da purificação.

4.4.4. Inserção dos amplicons no plasmídeo comercial

Os *amplicons* foram inseridos em plasmídeo pGEM®-T Easy *Vector Systems* ou em plasmídeo pGEM®-T *Vector Systems*. Os fragmentos foram adicionados aos componentes do *kit* da seguinte forma (Tabela 2):

Tabela 2: Condições da reação de inserção do fragmento de DNA do Adenovirus no plasmídeo comercial.

Componentes	Quantidade
2X Rapid Ligation Buffer	5,0 µL
pGEM-T ou pGEM®-T *Easy Vector* (50ng/µl)	1,0 µL
Fragmentos 500 ng/ µl	0,5 µL
T4 DNA ligase	1,0 µL
H_2O	2,5 µL

A reação de ligação foi realizada *overnight* à temperatura ambiente.

4.4.5. Transformação de Escherichia coli

A transformação foi realizada utilizando células competentes de *Escherichia coli* gentilmente cedida pelo Prof. Mário Hirata, Departamento de Analises Clínicas e Toxicológicas-FCF/USP. A transformação foi realizada em tubo de microcentrífuga, adicionando 100µL de *E. coli* competente a 10µL de solução da reação de inserção. No total, foram adicionados 50ng de DNA plasmidial. Os tubos foram acondicionados em banho de gelo por 30min e logo após esse período, foram mantidos em banho-maria 42°C por 2min. Após essa incubação, 1mL de meio LB (Meio Luria-Bertani) foi adicionado nos tubos mantidos a 37°C por 1 h. Em placas com meio LB 1% de ágar + 100 µg/mL de Amp (ampicilina), foram adicionados 100 µL do material incubado, mantendo os em estufa 37 °C por 16 h.

4.4.6. Seleção de bactérias transformadas

A transformação das bactérias, ou seja, a inserção do plasmídeo produzido nas *E. coli* permitiu obter bactérias com o plasmídeo e portando resistência a ampicilina. Após 16 h de incubação no meio LB 1% de ágar, 100 µg/mL de ampicilina as colônias com maior crescimento foram selecionadas e colocadas em

5mL de meio LB-Caldo com ampicilina 100 µg/mL em *shaker* a 140 RPM, 37ºC por 18 horas. Após esse tempo o caldo foi utilizado para extrair o DNA plasmidial.

4.4.7. Extração de plasmídeo

Foi utilizado o *kit* "*HiYield*™ *Plasmid* Mini *Kit* / 96-*well Plasmid Kit*" da RBC Bioscience® seguindo o protocolo do fabricante. Foram obtidos 30 µL de DNA plasmidial para cada colônia replicada em meio LB-caldo. A quantificação da concentração de plasmídeos foi realizada utilizando o NanoDrop®.

4.5. EXTRAÇÃO DO DNA ADENOVIRAL PARA REAÇÕES DE PCRQ

O processo de extração do DNA adenoviral foi baseado no processo descrito por Wold & Tollefson *et al.* (2007). As amostras testes foram diluídas, 5µL de amostra em 45µL de água para as amostras da fase pobre em micelas (Fd) e uma diluição seriada com esses volumes foi realizada para as amostras da fase rica em micelas (Fc) até diluir 100X. A essa diluição foram adicionados 9,3µL de Proteinase K *master mix* (Tabela 3). Incubaram-se as amostras a 37°C por 60min. O material digerido foi utilizado nas reações de PCRq.

Tabela 3: Condições da reação de digestão por Proteinase K.

Componente	Quantidade
Tampão de digestão da Proteinase K (6,6X)*	9,0 µL
Proteinase K (15,6 mg/mL)	0,3 µL
Amostras teste diluídas	50,0 µL

O tampão de digestão da Proteinase K (6,6X) era composto por: Tris-HCl 66,6mM, pH 8,0; Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 66,6mM, Dodecil sulfato de sódio (SDS) 1,65% (m/v).

4.6. METODOLOGIAS ANALÍTICAS

4.6.1. PCRq, método de Ct

Para as reações de PCRq foi utilizado o kit “SYBR® Green PCR Master Mix” no sistema 7500 Fast Real-Time PCR da Applied Biosystems®. As reações foram realizadas utilizando um volume de reação de 10µL. As reações foram realizadas em quatro estágios. O primeiro estágio foi realizado a 50°C por 2min, o segundo a 95°C por 10min, o terceiro foi realizado 40 ciclos de duas etapas; 95°C por 15s, seguido de 60°C por 1 min (essa foi a temperatura utilizada, a menos se descrito a mudança). A quarta etapa foi uma etapa de dissociação, realizada em outras três etapas; 95°C 15s, seguido de 60°C por 1min e 95°C por 15s. Os resultados foram analisados utilizando software “7500 System SDS” e o Microsoft Office Excell. O valor determinado pelo aparelho denominado de Ct (Ciclo em que a reação atinge a linha de amarração) foi utilizado para quantificar as concentrações de adenovírus nas amostras. Uma curva padrão foi realizada utilizando os valores de Ct para a diluição seriada do DNA plasmidial de concentração conhecida. A curva padrão permitiu quantificar as amostras de concentração de DNA desconhecida. Todas as amostras foram diluídas 50X antes de realizar as reações de PCRq.

O método Ct assume que as condições da reação do padrão (DNA plasmidial) são as mesmas para as reações das amostras uma vez que se baseiam em uma linha de amarração para determinar os valores de Ct. Para avaliar essa suposição, outro método baseado no artigo de Guescini *et al* (2008) analisa os resultados sem assumir mesmas condições de reação entre amostra e padrão.

4.6.2. PCRq, Método Cy0

O método Cy0 baseia-se no ajuste não linear da função de Richard (RICHARDS, 1959) (Equação 1) aos resultados brutos da reação de PCRq. O valor Cy0 é o ponto de interseção entre o eixo da abcissa e a tangente do ponto de inflexão da curva de Richard obtida pela regressão não linear dos dados brutos (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**).

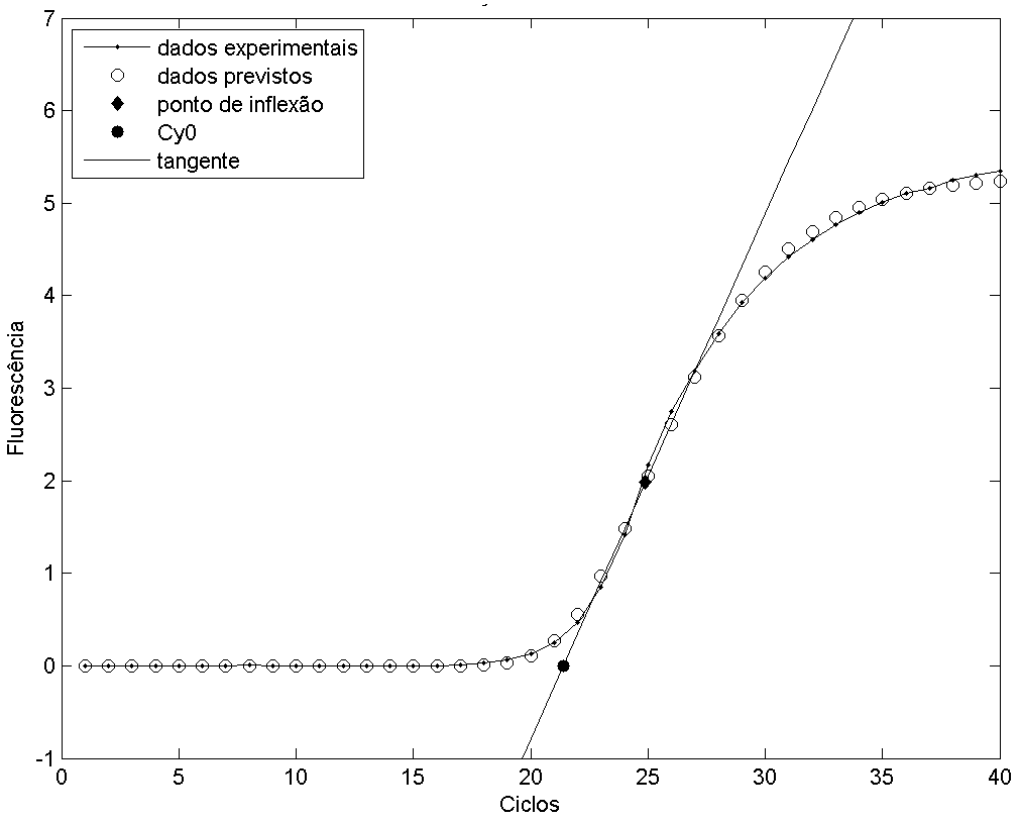

Figura 8: Exemplo de modelagem da reação de PCR utilizando a equação de Richard.
Fonte: Autor
Fluorescência (ΔRn), fluorescência do SYBR® green normalizada pelo fluoróforo ROX. Abscissa em valores de ciclos de reações em cadeia da polimerase.

O método foi realizado pelo ajuste da regressão não linear da equação de Richard, uma extensão da curva logística de crescimento, de forma a ajustar as leituras de fluorescência à equação de Richard (Equação 1).

$$\boldsymbol{F_x = \frac{F_{max}}{\left[1 + e^{\left(\frac{-1}{b}(x-c)\right)}\right]} + F_b}$$ **Equação 1**

Em que *x* é o número do ciclo, F_x é fluorescência da reação no ciclo *x, Fmax* é a fluorescência máxima da reação, *c* é o ciclo fracionário do ponto de inflexão da curva, *d* representa o coeficiente de Richard e *Fb* é a fluorescência base.

As coordenadas do ponto de inflexão foram calculadas com a Equação 2.

$$\boldsymbol{Flex = \left[c + b \ln d\,;\ F_{max}\left(\frac{d}{d+1}\right)^{d} + F_b\right]}$$ **Equação 2**

e a inclinação da tangente (m) foi estimada com (Equação 3):

$$\boldsymbol{m = \frac{F_{max}}{b}\left(\frac{d}{d+1}\right)^{d+1}}$$ **Equação 3**

Os 5 parâmetros que caracterizam cada reação foram utilizados para calcular o Cy0 pela Equação 4

$$\boldsymbol{C_{y0} = \mathrm{c} + b\ln d - b\left(\frac{d+1}{d}\right)\left[1 - \frac{F_b}{F_{max}}\left(\frac{d+1}{d}\right)^{d}\right]}$$ **Equação 4**

Para automatizar essas contas um programa escrito no MATLAB R2009a, foi desenvolvido utilizando um complemento que realizava o ajuste da equação de Richard e determinava os cinco parâmetros utilizando uma série de Taylor. O ajuste foi realizado até que a variação relativa do Cy0 entre iteradas consecutivas fosse menor que 0,001. Os valores de Cy0 foram determinados para as amostras de concentração de DNA desconhecidas e para as reações do padrão de concentração de DNA conhecidos. Uma curva padrão relacionando os valores obtidos com a diluição seriada do padrão foi determinada correlacionando os valores de Cy0 com concentração de DNA.

4.6.3. Teste de infectividade baseado em PCRq

O teste de infectividade foi preparado com descrito anteriormente. O princípio dessa análise se baseia em realizar diluições seriadas da amostra teste em placas de 96 poços, com 8 replicatas. A concentração de partículas adenovirais nas amostras foi determinada previamente através do PCRq. Em posse dessa informação é possível calcular a concentração final de partículas adenovirais nos poços no inicio da infecção. Após 72 horas, a concentração é novamente determinada através de PCRq. Se o número de partículas quantificadas for superior ao inserido é plausível de se concluir que houve replicação viral e, portanto, havia partículas infecciosas na amostra. Apesar de que erros analíticos possam gerar resultados falsos positivos ou falsos negativos, as partículas virais infecciosas tem

alta capacidade de replicação aumentando sua concentração rapidamente reduzindo esse risco. Algumas equações foram propostas para avaliar os resultados encontrados e relacionar com a infectividade viral. Elas estão descritas e explicadas no item “Parâmetros de avaliação do sistema”.

4.6.4. Quantificação de proteínas totais

As proteínas totais foram determinadas utilizando o kit BCA *Assay kit* da Sigma-Aldrich. Quantificações foram realizadas em placas de 96 poços seguindo as recomendações do fabricante e a leitura foi feita em leitor de placas a 562 nm.

4.7. PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO DO SISTEMA

Para avaliar a influência das variáveis escolhidas (Temperatura de extração, pH da suspensão viral e concentração de tensoativo) alguns parâmetros de avaliação foram determinados e estão descritos abaixo, os valores de concentração de cópias de DNA adenoviral obtidos pelas metodologias de PCRq foram consideradas como concentração de partículas virais, uma boa suposição como demonstrado por (WANG, F. *et al.*, 2005).

A razão entre os volumes das fases permite observar a proporção de volume entre as fases (Equação 5).

$$\boldsymbol{V_R = \frac{V_d}{V_c}}$$ **Equação 5**

Em que, V_d é o volume da fase diluída em tensoativo e V_c é o volume da fase concentrada em tensoativo.

O coeficiente de partição (K) indica a relação de distribuição da bioparticula alvo no sistema de duas fases. No presente trabalho o coeficiente de partição foi determinado para as partículas virais (K_a) (Equação 6);

$$\boldsymbol{K_a = \frac{[Ad5_{Fd}]}{[Ad5_{Fc}]}}$$ **Equação 6**

Em que, $[Ad5_{Fd}]$ é a concentração de adenovírus na fase diluída em tensoativo, $[Ad5_{Fc}]$ é a concentração de adenovírus na fase concentrada em tensoativo.

Valores K_a maiores que 1 indicam partição preferencial para a fase diluída e menores que 1 para a fase concentrada. Se o objetivo é recuperar todas as biopartículas em uma das fases, valores elevados ou reduzidos devem ser buscados.

Outro parâmetro que deve ser avaliado é o rendimento de recuperação do adenovírus (Y_a). Foi determinado o rendimento para todas as fases de acordo com a Equação 7 e Equação 8, o rendimento da fase diluída possui o índice F_d, e o rendimento da fase concentrada o índice F_c;

$$\boldsymbol{Y_{a\,Fd} = \frac{[Ad5_{F_d}](V_{F_d})}{[Ad5_{F_i}](V_{F_i})}}$$ **Equação 7**

$$\boldsymbol{Y_{a\,Fc} = \frac{[Ad5_{F_c}](V_{F_c})}{[Ad5_{F_i}](V_{F_i})}}$$ **Equação 8**

Em que, Y_a F_d é o rendimento da fase diluída, Y_a F_c é o rendimento da fase concentrada, V_{Fd} e V_{Fc} são os volumes das fases diluídas e concentradas, respectivamente, V_{Fi} é o volume de suspensão viral adicionada ao sistema e $[Ad5_{Fi}]$ é a concentração de adenovírus na suspensão viral.

O Balanço de partículas virais (B_p) pode ser calculado adicionando os rendimentos de cada fase (Equação 9). Esse parâmetro permite avaliar se esta ocorrendo perda de partículas virais em outra parte do sistema, por exemplo, precipitação na interfase.

$$\boldsymbol{B_p = Y_{a\,Fc} + Y_{a\,Fd}}$$ **Equação 9**

O fator de concentração (C_a) é um parâmetro que avalia se houve aumento na concentração de adenovírus e foi calculado para a fase diluída como descrito abaixo (Equação 10).

$$\boldsymbol{C_a = \frac{[Ad5_{Fd}]}{[Ad5_{Fi}\,]}}$$ **Equação 10**

Outro parâmetro importante para avaliar a eficiência de um processo de extração é o fator de purificação (Equação 11),

$$\boldsymbol{F_p = \frac{\frac{[Ad5_{Fd}]}{[Ptn_{Fd}]}}{\frac{[Ad5_{Fi}\,]}{[Ptn_{Fi}]}}}$$ **Equação 11**

Em que, $[Ptn_{Fd}]$ é a concentração de proteínas totais na fase diluída em tensoativo, $[Ptn_{Fi}]$ é a concentração de proteínas totais na suspensão viral.

Em ordem para avaliar a infectividade viral alguns parâmetros foram propostos e seguem descritos abaixo.

Potência viral (P_v) foi definido como a relação entre a concentração de partículas virais no inicio da infecção pela concentração de partículas virais após o tempo de infecção. A relação é calculada com a Equação 12,

$$\boldsymbol{P_v = \frac{[Ad5_f]}{[Ad5_i\,]}}$$ **Equação 12**

Em que, $[Ad5_f]$ é a concentração de partículas virais após o período de infecção e $[Ad5_i]$ é a concentração de partículas virais no início da infecção.

A média dos resultados de cada poço foi realizada e definida como o resultado de potência viral da amostra testada. Utilizaram-se os valores dos poços nas diluições de 10^{-2} a 10^{-5} excluindo-se os poços de extremidade. Essa exclusão foi

adotada para reduzir a influência do efeito de borda comum em ensaios em vitro. A Figura 9 demonstra os resultados utilizados.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	...				10^{-10}	CC	CC
B		10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}					10^{-10}	CC	CC
C		10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}					10^{-10}	CC	CC
D		10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}					10^{-10}	CC	CC
E		10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}					10^{-10}	CC	CC
F		10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}					10^{-10}	CC	CC
G		10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}					10^{-10}	CC	CC
H		10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}					10^{-10}	CC	CC

Figura 9: Esquema de placa de 96 poços demonstrando poços utilizados.
Fonte: Autor
Os valores encontrados dentro das células indicam a diluição adicionada aos poços, CC corresponde aos controles celulares, a caixa delimita os poços utilizados para calcular a potência viral.

Outro parâmetro estudado foi a recuperação da potência viral (R_{Pv}) onde relaciona-se a potência viral encontrada para a suspensão viral utilizada no preparo dos sistemas e a potência viral encontrada para as amostras testadas (Equação 13). Os valores são expressos em porcentagem (%).

$$R_{Pv} = \frac{P_{va}}{P_{vp}} \times 100$$ **Equação 13**

Em que, P_{va} é a potência viral da amostra de fase testada e P_{vp} é a potência viral da suspensão viral utilizada no preparo dos sistemas.

Em ordem para avaliar a remoção seletiva de partículas virais não infeciosas o parâmetro Potência viral específica ($P_{v\varphi}$) foi calculado. A potência viral específica correlaciona a potência viral com o concentração de partículas virais. Portanto, valores elevados de Potência viral específica indicam que houve aumento da proporção de partículas virais infecciosas por partículas virais totais. Ela é calculada como descrito a seguir (Equação 14),

$$\boldsymbol{P_{v\varphi}} = \frac{\boldsymbol{P_{v\varphi}} \times \mathbf{10^7}}{[\boldsymbol{Ad}\mathbf{5}]}$$ **Equação 14**

O valor de P_v foi multiplicado por 10^7 para normalizar os valores, tendo em vista que os valores encontrados para concentração de partículas adenovirais [Ad5] são elevados.

Outro parâmetro estudado foi a recuperação da potência viral específica ($R_{Pv\varphi}$) onde relaciona-se a potência viral específica encontrada para a suspensão viral utilizada no preparo dos sistemas e a potência viral encontrada para as amostras das fases testadas. Os valores são expressos em porcentagem (%).

$$\boldsymbol{R_{Pv\varphi}} = \frac{\boldsymbol{P_{va\varphi}}}{\boldsymbol{P_{vp\varphi}}} \times \mathbf{100}$$ **Equação 15**

Em que, $P_{va\varphi}$ é a potência viral específica para a amostra testada e $P_{vp\varphi}$ é a potência viral específica para a suspensão viral inicial, utilizada como padrão.

Esse parâmetro permite avaliar se houve aumento da potência viral específica em relação à suspensão viral ou se houve perda durante o processo de extração.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. OBTENÇÃO DO VÍRUS

Os Adenovírus foram cultivados em células HEK-293, que foram monitoradas para observação de efeitos citopáticos. Diferentes graus de ECP ao longo dos dias de incubação dos ensaios foram observados. As **Erro! Fonte de referência não encontrada.**, 11 e 12 mostram fotos com diferentes graus de infecção, assim como um controle celular. A intensidade do ECP é dependente da concentração de vírions utilizadas para infectar as células HEK-293 e o tempo de incubação com o vírus. O efeito citopático se caracteriza pelo arredondamento celular e desprendimento da monocamada. A morfologia celular foi utilizada como controle de processo para obtenção do adenovírus.

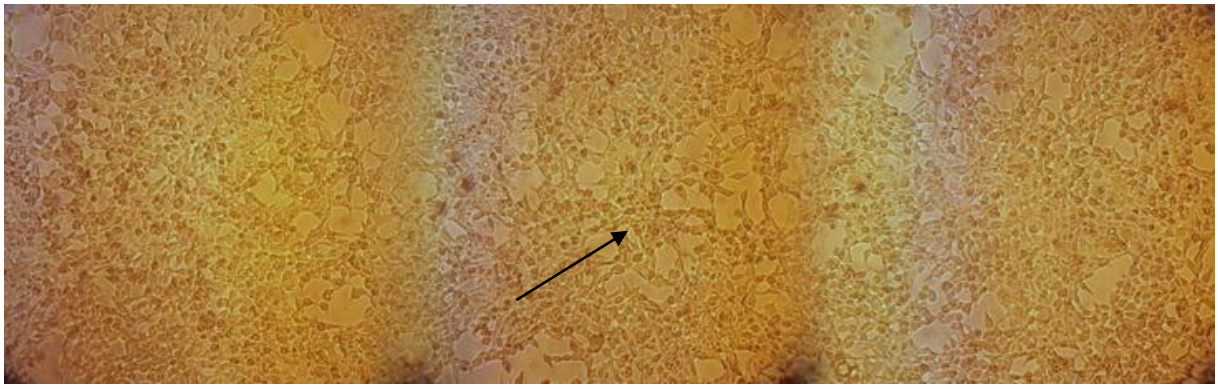

Figura 10: Foto exemplo de infecção com inicio da formação de agregados celulares.
Fonte: Autor
Observa-se o ECP de adenovírus em células HEK-293, onde as células infectadas começam a se alterar (indicado pela seta →). A imagem foi alterada utilizando o programa Picasa 3®, as alterações foram feitas para remover tons indesejáveis relacionados ao meio de cultivo e para recortar parte da foto. A foto foi tirada em modo panorâmico para aumentar o campo de observação.

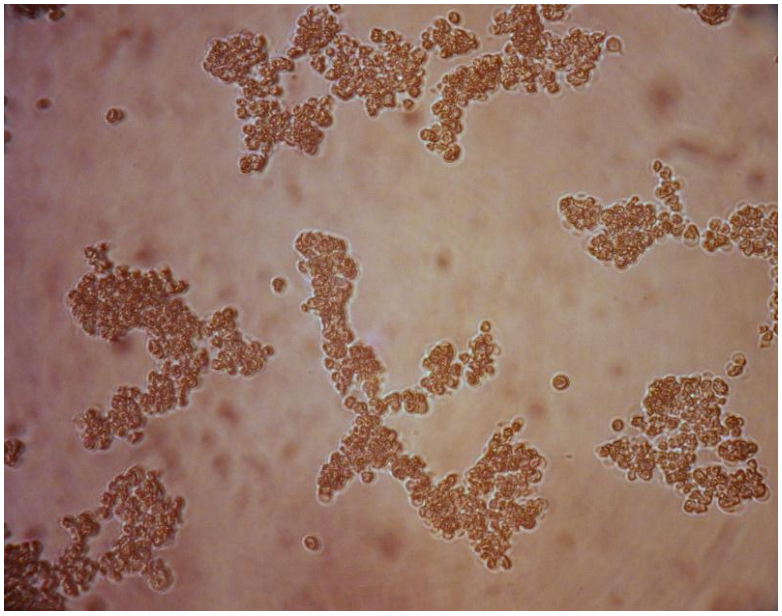

Figura 11: Foto exemplo de ECP intenso do adenovirus em células HEK-293.
Fonte: Autor
A imagem foi alterada utilizando o programa Picasa 3®, as alterações foram feitas para remover tons indesejáveis relacionados ao meio de cultivo e para recortar parte da foto.

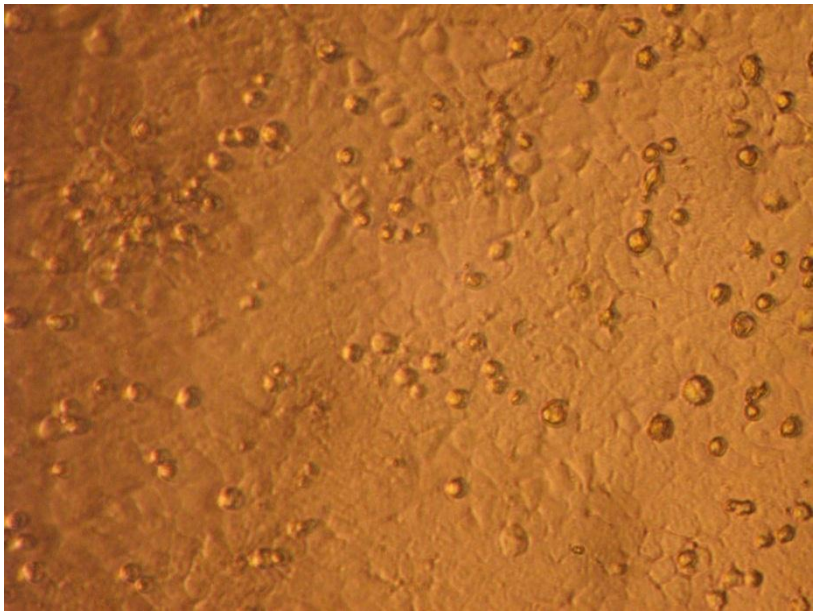

Figura 12: Foto exemplo de uma monocamada de células HEK-293 controle.
Fonte: Autor
Células HEK-293, controle negativo.

No final do período de cultivo de HAdv-5, todas as suspensões virais foram reunidas em um mesmo recipiente afim de homogeneizar e gerar um estoque aliquotado com mesma concentração de partículas adenovirais e composição. A suspensão foi aliquotada em tubos de centrifuga num volume final de 12mL por tubo. Esse processo foi adotado para permitir o mesmo número de ciclos de

congelamento e descongelamento para todos os testes, para evitar variação devida à degradação viral nesse processo. Portanto todos os testes possuem o mesmo número de ciclos de congelamento e descongelamento.

5.2. DIAGRAMA DE FASES

O diagrama de fases do SMDFA foi determinado pelo método de ponto de névoa (BLANKSCHTEIN, DANIEL *et al.*, 1986). Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 13.

A curva binodal, também chamada de curva de coexistência, divide o gráfico em duas regiões. A região abaixo da curva binodal constitui o conjunto de condições em que a solução é monofásica. A região acima da curva binodal constitui as condições em que o sistema é bifásico Figura 14.

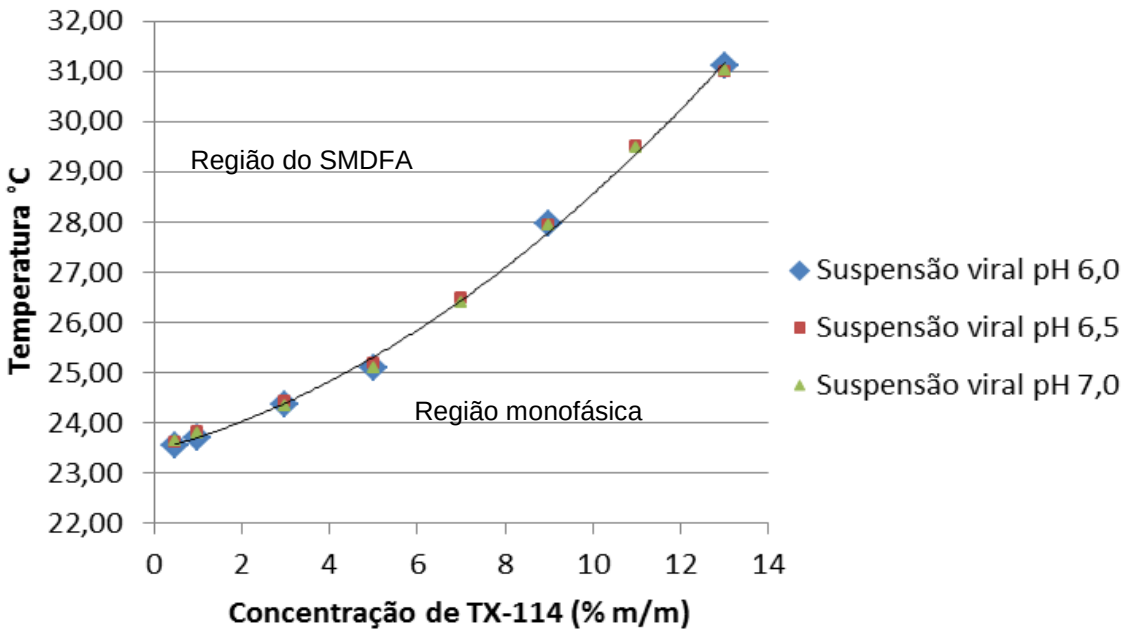

Figura 13: Diagrama de Fases dos sistemas micelares.
Fonte: Autor
Os sistemas foram compostos de Triton X-114 e de suspensões adenovirais em diferentes pHs. A linha continua representa a linha de tendência dos resultados. Condições abaixo dos pontos apresentados formam sistemas monofásicos e condições acima formam o sistema micelar de duas fases aquosas (SMDFA).

Alguns sistemas preparados com a suspensão viral estão apresentados nas Figuras 14. Observou-se na formação dos sistemas a presença de cor intensa na fase concentrada em tensoativo. A cor é originada do indicador de pH presente no

meio de cultivo (vermelho fenol ou fenolsulfoftaleína) que apresenta cor amarela em pH abaixo de 6,6 e vermelha em pH acima desse valor. O fato de se deslocar para a fase rica em micela indica característica hidrofóbica da molécula ou uma interação com o tensoativo. A intensidade da cor nas fases diluídas (superior) é menor nos sistemas com maior concentração de tensoativo devido a uma maior remoção para a fase rica em micelas, maior nos sistemas com elevada concentração de tensoativo.

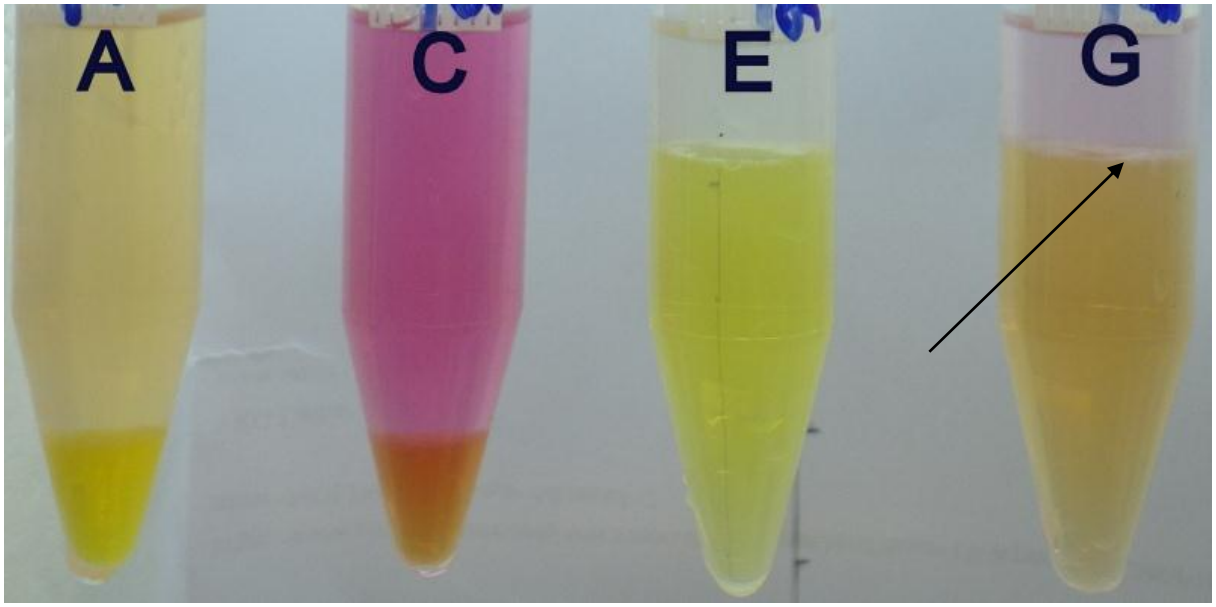

Figura 14: Exemplo de sistemas formados por suspensão viral e TX-114.
Fonte: Autor
Todos os sistemas preparados foram acondicionados a 33°C com massa total de 5g. Sistema A possui suspensão viral em pH 6,0 e 1 % (m/m) de Triton X-114, Sistema B possui suspensão viral em pH 7,0 e 1 % (m/m) de Triton X-114, Sistema E possui suspensão viral em pH 6,0 e 11% (m/m) de Triton X-114 e Sistema G possui suspensão viral pH 7,0 e 11% (m/m) de Triton X-114. Precipitado entre as interfases indicado com seta (→).

Durante o preparo dos sistemas foi observado o depósito de material na interfase dos sistemas. Provavelmente esse material corresponde a restos celulares. Essa hipótese, se verdadeira, poderia implicar em um ganho no processo de extração, por acoplar duas etapas em uma, remoção de material particulado (Clarificação) e extração das partículas adenovirais. Em todos os sistemas foi observada a formação desse depósito.

5.3. PRODUÇÃO DO PLASMÍDEO

O plasmídeo foi preparado como descrito no item Material e Métodos. O processo foi realizado em etapas e os resultados estão descritos abaixo. Os

amplicons foram produzidos em uma reação de PCR e analisados no NanoDrop®. O resultado está na Tabela 4.

Tabela 4: Valores de quantificação por NanoDrop® do produto do PCR extraído (ng/µL) e da relação de absorbância em 260 e 280 nm.

Amostra	Relação 260/280	Concentração ng/ µL
1,2	1,80	2320,0
3,4	1,77	2225,8

1,2 = produto da reação de PCR utilizando o par de iniciadores hexAA1885 e hexAA1913; **3,4** = produto da reação de PCR utilizando o par de iniciadores, nehex AA1893 e nehex AA1905.

Os produtos do PCR foram diluídos para uma concentração padrão de 500ng/µL, sugerido pelo Kit pGEM®-T *Easy Vector***.** O fragmento foi então inserido no plasmídeo e foi utilizado na transformação de *E. coli* competentes. O cultivo das bactérias transformadas permitiu a produção do plasmídeo clonado. O plasmídeo 3,4 não foi mais utilizado devido à presença de dímeros na reação de PCR, como discutido abaixo. O plasmídeo 1,2 foi utilizado para o preparo das curvas padrões. Os resultados de quantificação estão descritos abaixo.

5.4. QUANTIFICAÇÃO DO PLASMÍDEO EM NANODROP®

O plasmídeo extraído foi diluído e quantificado em NANODROP®. A quantificação foi realizada em dias diferentes e realizada 15 vezes. O resultado obtido dessa quantificação está descrito na Tabela 5.

Tabela 5: Quantificação do DNA plasmidial extraído de *E. coli* transformada.

	Concentração de DNA plasmidial (ng/µL)	Desvio padrão	DPR (%)
Plasmídeo 1,2	49,5	2,35	4,75

*DPR (%): Desvio padrão relativo.

Para quantificar amostras desconhecidas é preciso um padrão devidamente caracterizado. O plasmídeo foi escolhido como padrão e sua concentração determinada com o NanoDrop®. Em posse da quantificação em massa por volume é possível calcular o número de cópias de DNA plasmidial por volume. Para realizar essa conversão foi necessário fazer a conversão dos valores de massa/volume para

cópias/volume. A sequência do plasmídeo comercial é conhecida assim como a sequência do fragmento amplificado (sequência retirada do genoma de Adenovírus humano sorotipo 5, número de acesso no NCBI AY339865). A massa molecular do plasmídeo formado pela soma dessas duas sequências foi feita com o *Oligo Calculator* da Universidade de Pittsburgh (http://www.pitt.edu/~rsup/OligoCalc.html). Os resultados encontrados encontram-se resumidos na Tabela 6.

Tabela 6: Massa molar e comprimento em pares de base do plasmídeo comercial, *amplicon* e plasmídeo modificado com as sequências do Adenovirus.

Material	Número de pares de base (pb)	Massa molar – Daltons (g/M)
pGEM®-T Easy Vector	3015	931253
Amplicon dos iniciadores hexAA1885 e hexAA1913	300	92733
Plasmídeo obtido	3315	1023986

A concentração em número de cópias pode então ser obtida através da Equação 16:

$$C_m = \frac{(C_g \times N_\alpha)}{MM}$$ **Equação 16**

Em que:

C_m: Concentração moléculas/µL

C_g: Concentração em g/µL

N_α: Constante de Avogadro

MM: Massa molar do plasmídeo obtido (g/mol)

Com isso obtivemos que o plasmídeo obtido com os *amplicons* do par de iniciadores hexAA1885 e hexAA1913 (Plasmídeo 1,2) possui numa solução com 60 ng/µL a concentração de 3,53 x 10^{10} moléculas de DNA plasmidial/µL.

5.5. LIMITAÇÕES NAS TÉCNICAS ANALÍTICAS

5.5.1. PCR quantitativo

A técnica de PCR quantitativo foi adicionada como ferramenta de quantificação do HAdv-5, sendo uma técnica com alta sensibilidade e especificidade. Existem relatos do emprego dessa técnica na quantificação de adenovírus com uma relação linear entre a técnica de PCR em tempo real e a determinação do titulo de partículas infecciosas por ensaio de *plaque* (WOLD; TOLLEFSON, 2007).

Para realizar o PCRq utilizamos o plasmídeo modificado com a sequência de interesse como nosso padrão. Os resultados obtidos foram analisados usando o software 7500 *System* SDS e o *Microsoft Office Excell*®. Algumas das opções de análise do software 7500 System SDS estão representados nas **Erro! Fonte de referência não encontrada.** e **Erro! Fonte de referência não encontrada.**.

Reações de PCRq são avaliadas utilizando o resultado de C_t, que é o ciclo fracionário em que determinada reação atingiu a linha de amarração (Linha verde, Figura 15). Todas as amostras foram testadas utilizando a linha de amarração em 0,5 de ΔRn, que está diretamente relacionado com a fluorescência gerada por cada reação.

Diluição seriada do plasmídeo modificado em concentrações conhecidas foi realizada com fator de diluição de 10X. Os valores de C_t obtidos para as diluições de concentração conhecidas foram utilizadas para correlacionar os valores de C_t com cópias de DNA por µL. Os valores de C_t para todas as amostras foram determinados e convertidos em valores de cópias de DNA por µL.

O plasmídeo 3,4 não foi mais utilizado, pois ao fazermos a análise de curva de dissociação, foi observada a presença de dois picos (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**). Esse resultado indica a presença de dois tipos de DNA dupla fita presente na reação, o pico adicional normalmente é relacionado à presença de dímeros dos iniciadores. Essa estrutura nas reações pode modificar os resultados das reações e por isso esse plasmídeo não foi mais utilizado. Testes foram realizados para remover essa estrutura, modificando se temperatura de anelamento, mas não foi possível removê-lo.

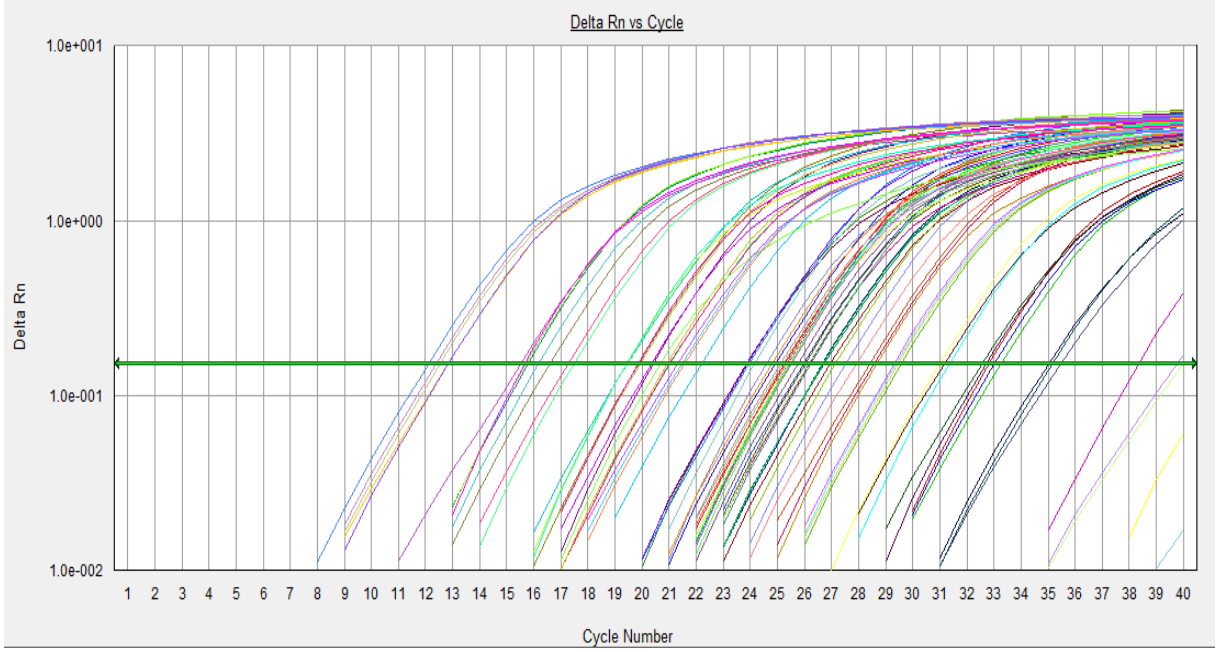

Figura 15: Exemplo de Curva ΔRn vs número do ciclo.
Fonte: Autor.
A abscissa (eixo X) representa os ciclos reacionais. O ordenada (eixo Y) é o ΔRn, que é a diferença da fluorescência do fluoróforo (SYBR®) repórter com a fluorescência do fluoróforo de referência (ROX).

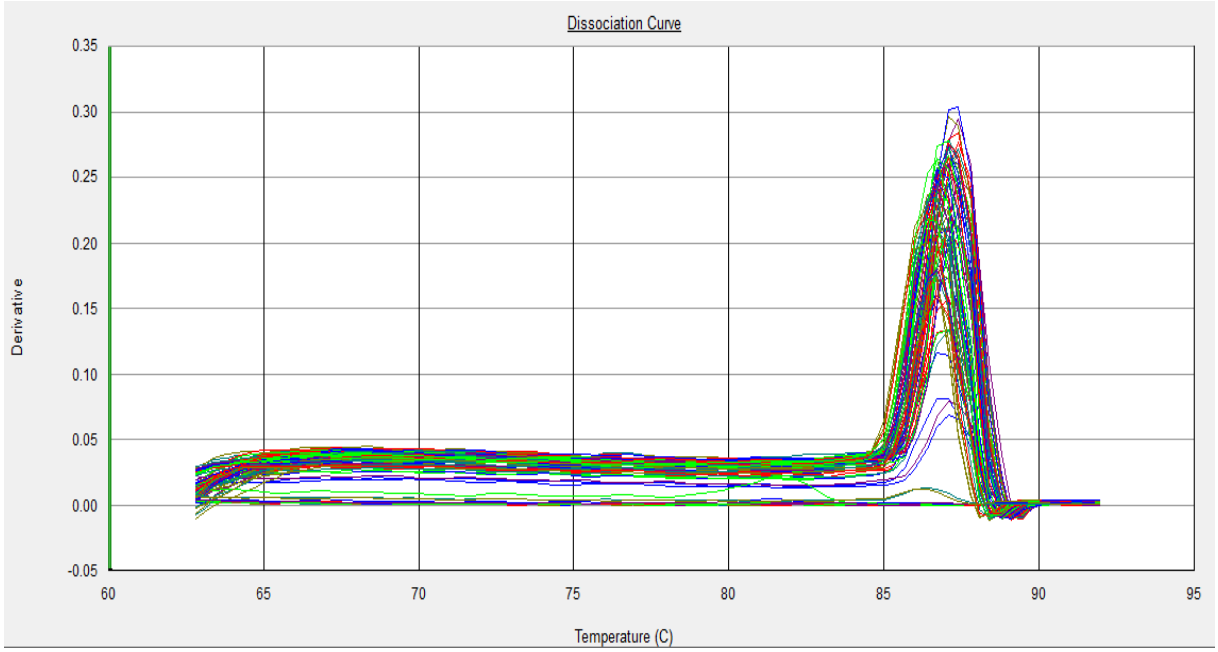

Figura 16: Exemplo de curva de dissociação de fitas de DNA.
Fonte: Autor
Ao fim das reações, a temperatura é elevada para dissociar as fitas de DNA, as fitas dissociadas não emitem fluorescência já que o fluoróforo é liberado. Essa variação é detectada pelo aparelho que determina a temperatura em que houve dissociação da fita de DNA e o fluoróforo.

A presença de mais de um tipo de pico indica presença de dois tipo de ácidos nucléicos, já que a temperatura de dissociação das fitas depende do tamanho e composição de ácidos nucléicos.

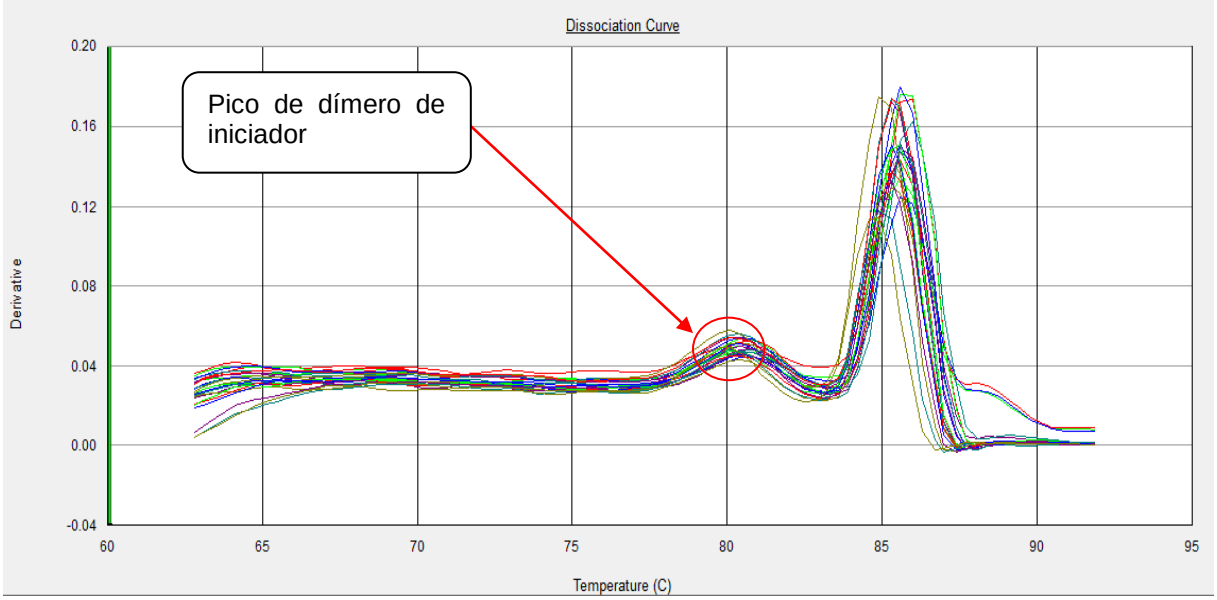

Figura 17: Resultado de curva de dissociação obtido com reações com os iniciadores nehex AA1893 e nehex AA1905 com o DNA do adenovirus.
Fonte: Autor
Seta indica pico não relacionado com o produto desejado da reação de PCR.

Erro! Fonte de referência não encontrada. mostra a presença de duas cadeias duplas de DNA diferentes na reação, indicando a presença de dímero de iniciadores.

5.5.2. Interferência dos componentes do sistema no teste de infectividade

Os componentes do sistema demonstraram interferência sobre as células Hep-2 previamente estudadas e substituídas pelas células HEK-293 (). A análise por microscopia ótica demonstrou que o tampão McIlvaine (utilizado em testes preliminares) em pH 5 altera a morfologia celular. Células submetidas a esse tampão apresentaram grânulos densos no citoplasma. A realização de dialise com tampão PBS reverteu essa característica do tampão. A principal característica que afetou as células foi o pH ácido desse tampão, que foi alterado com a dialise para condições mais brandas para as células.

A análise por microscopia de luz da monocamada celular sob o efeito dos outros tampões não indicou muita interferência sobre a morfologia das células Hep-2 (Figura 21 e 22).

As células submetidas ao tampão em pH 7,0 não apresentaram alterações em sua morfologia, isso se deve ao pH (próximo ao de cultivo). As células submetidas ao tampão dialisado apresentaram células apoptóticas, mas isso se deve ao processo normal da célula de cultivo celular.

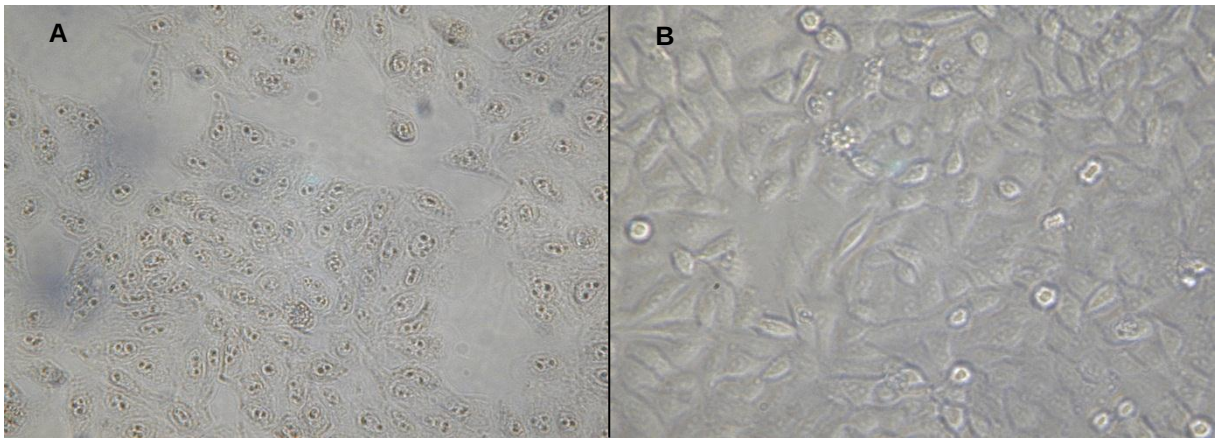

Figura 18: Monocamada de células Hep-2 com tampão McIlvaine em pH 5.
Fonte: Autor
A células Hep-2 banhadas com tampão McIlvaine pH 5 por 30 min. **B** células Hep-2 banhadas com tampão McIlvaine pH 5, dialisado com PBS, por 30 min.

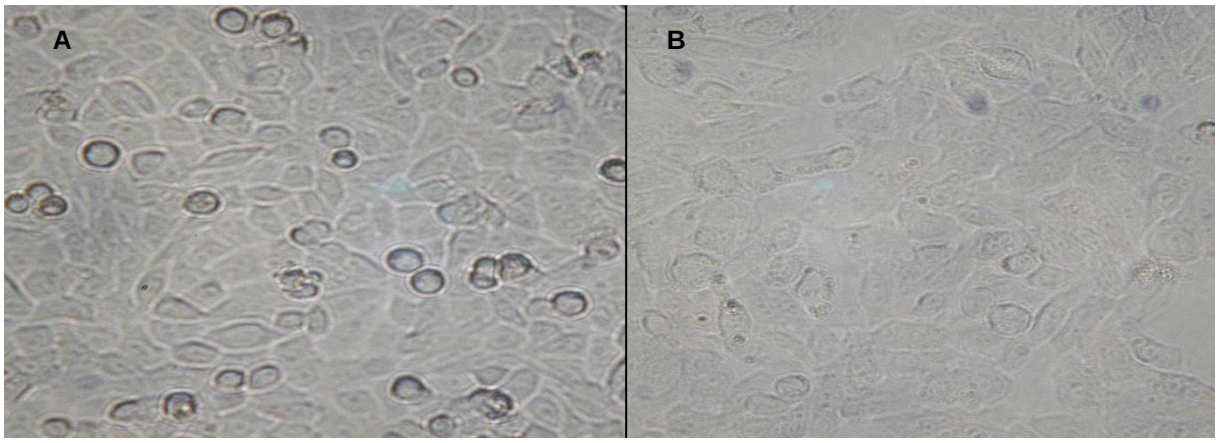

Figura 19: Monocamada de células Hep-2 com tampão McIlvaine em pH 6.
Fonte: Autor
A células Hep-2 banhadas com tampão McIlvaine pH 6 por 30 min. **B** células Hep-2 banhadas com tampão McIlvaine pH 6, dialisado com PBS, por 30 min.

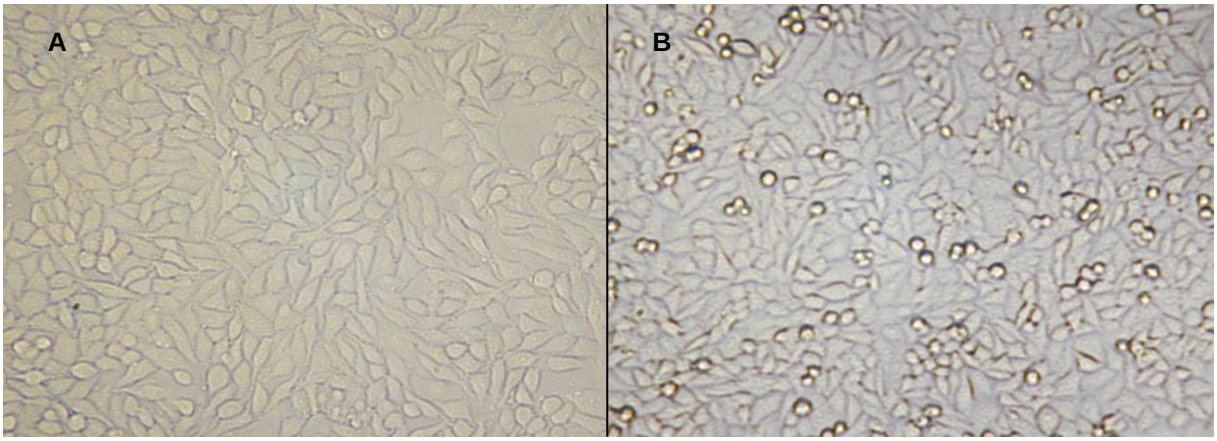

Figura 20: Monocamada de células Hep-2 com tampão McIlvaine em pH 7.
Fonte: Autor
A células Hep-2 banhadas com tampão McIlvaine pH 7 por 30 min. **B** células Hep-2 banhadas com tampão McIlvaine pH 7, dialisado com PBS, por 30 min.

A análise por microscopia de luz das células submetidas a diferentes concentrações de Triton X-114 mostrou um tipo diferente de interferência. Em ambos os casos (Figura 21 e 22) a imagem da microscopia apresenta-se turva, isso se deve a formação de micelas na solução que banha as células. Apesar da turbidez foi possível fazer algumas observações. O teste com menor concentração de Triton X-114 apresentou depósitos de Triton X-114 sobre as células em forma de gotas (Figura 21).

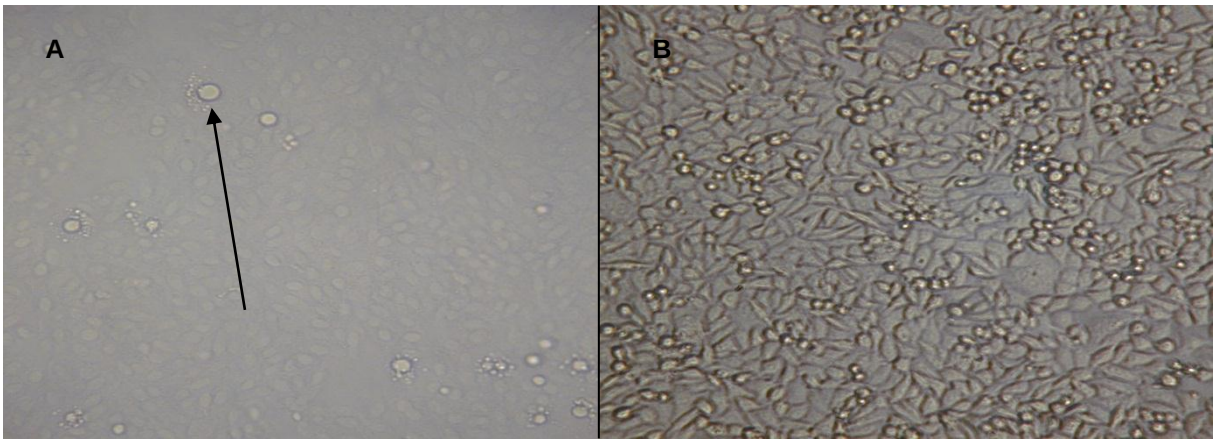

Figura 21: Monocamada de células Hep-2 com Triton X-114 em concentração de 0,05%.
Fonte: Autor
A - células Hep-2 banhadas com Triton X-114 (0,05%, m/v) em MEM por 30 min. **B** células Hep-2 banhadas com Triton X-114 (0,05%, m/v) em MEM, dialisado com PBS, por 30 min. → Gota de Triton X-114 depositado sobre a monocamada de células.

A análise por microscopia de luz das células submetidas a uma maior concentração de Triton X-114 (16%, m/v) não se observou alteração morfológica das células, porém a análise foi dificultada pela turbidez da solução (Figura 22). A diálise

com essa concentração não foi efetiva, pois a concentração de Triton X-114 continuou elevada, mesmo após trocas de tampão de diálise consecutivas. Uma observação a olho nu possibilitou observar que o SMDFA formou-se sobre a monocamada de células, com a fase rica em tensoativo diretamente sobre as células e uma fase diluída na porção superior. Essa observação abriu a oportunidade para testar o sistema sem adição de Tampão McIlvaine, utilizando a suspensão viral nos sistemas direto com o Triton X-114.

Os testes de infectividade foram realizados apenas para a fase diluída em tensoativo devido à interferência desse componente.

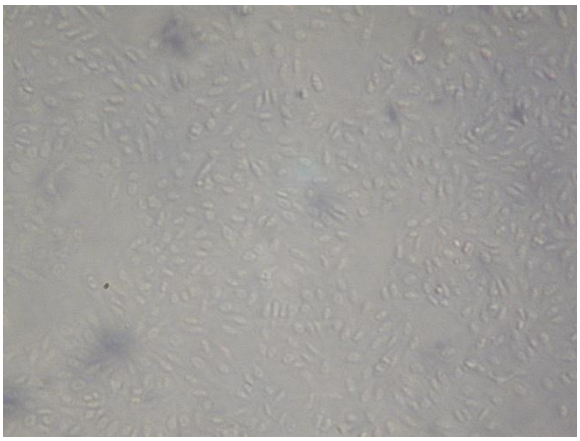

Figura 22: Monocamada de células Hep-2 com Triton X-114 em concentração de 16% em MEM.
Fonte: Autor

Análise a olho nu indicou formação do SMDFA dentro dos poços.

5.6. ANÁLISE DO PLANEJAMENTO FATORIAL COM PONTOS CENTRAIS.

O planejamento fatorial com pontos centrais possibilitou avaliar a influência de três variáveis (temperatura de extração, pH da suspensão viral e concentração do Triton X-114) e suas interações. Todos os parâmetros do sistema foram avaliados utilizando essa ferramenta estatística. O planejamento fatorial foi realizado duas vezes, porém com dois tempos de extração diferentes, um foi conduzido com aproximadamente 8h (Planejamento 1) de extração e ou outro com aproximadamente 24h (Planejamento 2) de extração.

A quantificação da suspensão viral produzida (lisado celular) foi realizada com PCRq em 61 replicatas de 19 extrações de DNA independentes, a média desse

resultado foi utilizada como número de partículas virais no lisado celular. A média encontrada com o método C_t foi de 1,44 x 10^7 partículas adenovirais/µL e de 1,47 x 10^7 partículas adenovirais/µL para o método Cy0. A quantificação das proteínas totais resultou em 1,226 g/L de proteínas no lisado celular.

5.6.1. Análise estatística – Planejamento 1

Os resultados obtidos nos ensaios do Planejamento 1 estão resumidos na Tabela 7. Os resultados relacionados à infectividade estão incompletos devido à perda de um dos ensaios durante os experimentos de infectividade. Esse ensaio teve contaminação cruzada e foi excluído das análises. Todos os parâmetros foram avaliados utilizando o software STATISTICA 10. Todos os parâmetros que tiveram algum efeito significativo ($p<0,05$) estão discutidos abaixo.

Tabela 7: Resultados do Planejamento 1, calculado pelo método C_t.

Ensaio	T (°C)	pH	[TX-114] (%m,m)	V_r	K_a	Y_a F_c (%)	Y_a F_d (%)	B_p	C_a	P_v	R_{Pv} (%)	$P_{v\phi}$	$R_{Pv\phi}$ (%)
A	33,0	6,0	1,0	15,67	0,13	22,00	44,88	66,89	0,47	211,34	19,26	311,20	40,75
B	37,0	6,0	1,0	19,00	94,53	0,02	44,29	44,32	0,46	494,25	45,05	745,35	97,61
C	33,0	7,0	1,0	15,67	443,70	0,01	35,23	35,24	0,37	3337,86	304,26	6261,80	820,00
D	37,0	7,0	1,0	19,00	0,15	7,73	21,96	29,69	0,23	3517,21	320,61	10697,13	1400,82
E	33,0	6,0	11,0	0,18	15,03	10,05	26,66	36,72	1,58	396,42	36,13	174,42	22,84
F	37,0	6,0	11,0	0,61	264,92	0,28	45,27	45,55	1,06	948,34	86,44	622,55	81,52
G	33,0	7,0	11,0	0,43	83,62	0,93	33,15	34,08	0,98	x	x	x	x
H	37,0	7,0	11,0	0,61	73,01	0,75	33,36	34,10	0,78	1330,13	121,25	1185,08	155,19
I	35,0	6,5	6,0	2,33	27,11	0,95	60,20	61,15	0,81	1924,18	175,40	1656,90	216,98
J	35,0	6,5	6,0	2,33	15,61	1,80	65,61	67,41	0,88	2209,05	201,36	1745,20	228,54
K	35,0	6,5	6,0	2,33	138,11	0,25	81,05	81,30	1,09	1348,42	122,91	862,37	112,93
L	35,0	6,5	6,0	2,33	10,87	3,13	79,43	82,56	1,07	1439,75	131,24	939,56	123,04

T: Temperatura (°C); V_r: Razão volumétrica; K_a: Coeficiente de partição; Y_a: Rendimento; F_c: Fase rica em micelas; F_d: Fase pobre em micelas; B_p: Balanço de partículas adenovirais; C_a: Fator de concentração; P_v: Potência viral; $P_{v\varphi}$: Potência viral específica; R: Recuperação (%).

5.6.1.1. *Coeficiente de partição Ka*

O coeficiente de partição demonstra a relação entre a concentração de partículas adenovirais na fase diluída em tensoativo com a concentração na fase rica em tensoativo. Os resultados obtidos estão representados nas Figura 23 e Tabela 8, abaixo. Nem um dos fatores principais teve efeito na partição viral, como pode ser visto na Figura 23, porém houve um efeito de interação significante ($p<0,05$). A interação temperatura e pH teve efeito negativo, o que significa que, quando os fatores estão em níveis opostos (nível baixo e alto) os valores de K_a são maiores (Figura 24).

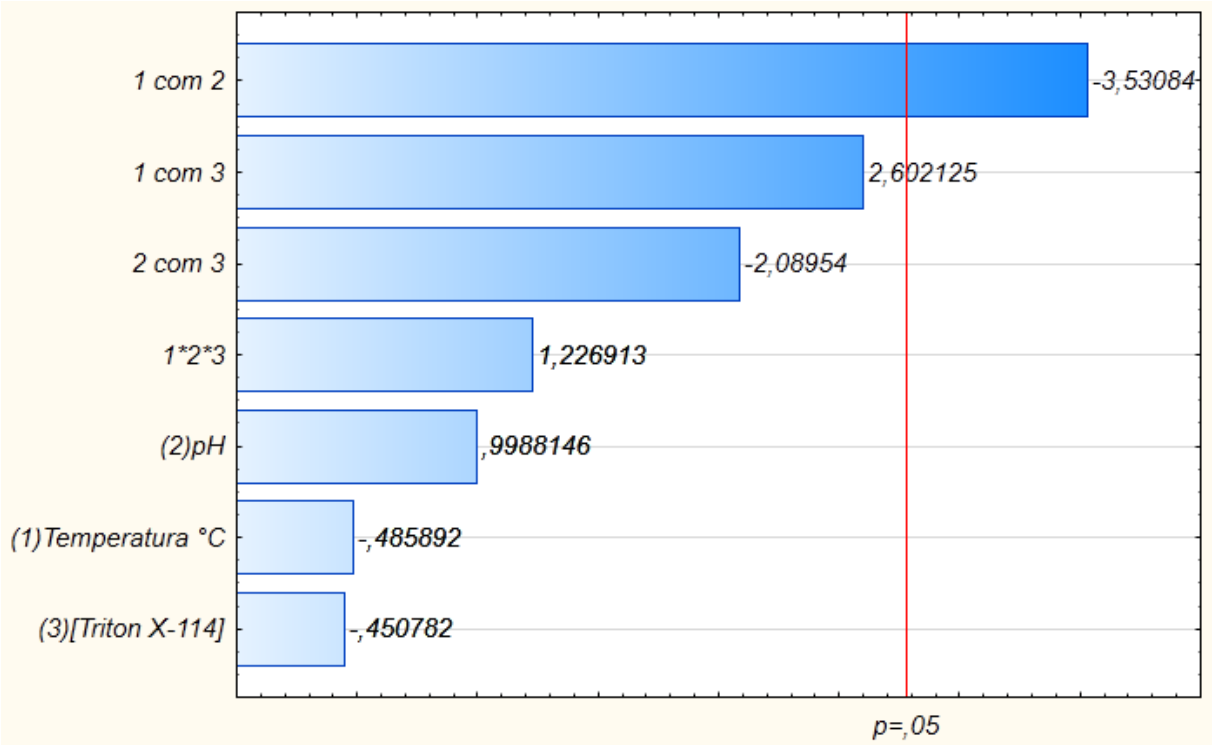

Figura 23: Gráfico de Pareto de efeitos padronizados; Variável: K_a.
Fonte: Autor
Cada barra indica um efeito. Interações estão indicadas com os pares e trios de números. **1**: Temperatura (°C), **2**: pH da suspensão viral, **3**: [Triton X-114] em % (m/m).

Nesse planejamento experimental foi alcançado valores de K_a próximos a 400, esses resultados indicam alta preferência das partículas virais para a fase diluída em tensoativo nessas condições estudadas.

A variação nos resultados de K_a foi grande, assim como em todos os parâmetros que dependem da quantificação de partículas adenovirais na fase concentrada em tensoativo. Isso acontece, pois, havia menores concentrações de

partículas nessa fase e alguns resultados foram próximos ao limite de linearidade da técnica. Outra dificuldade foi a viscosidade dessa fase, que não permitiu alta reprodutibilidade na remoção de volumes para os testes.

Apesar dessa variação foi possível observar o efeito de interação entre temperatura e pH, como pode ser observado na Tabela 8, onde o efeito da interação desses dois fatores foi significante ($p<0,05$).

Tabela 8: Análise de variância (ANOVA) do K_a.

Fator	SQ	Grau de Liberdade	Média dos quadrados	F	p
(1) T°C	1509,2	1	1509,15	0,23609	0,6525
(2) pH	6377,1	1	6377,09	0,99763	0,3744
(3) [Triton X-114]	1298,9	1	1298,93	0,20320	0,6755
1 com 2	79690,9	1	79690,93	12,46683	0,0242
1 com 3	43282,2	1	43282,19	6,77106	0,0599
2 com 3	27909,8	1	27909,76	4,36620	0,1049
1*2*3	9622,3	1	9622,33	1,50532	0,2871
Erro	25569,0	4	6392,24		
Total SQ	195259,3	11			

Ajuste R^2 = 0,87.
*Valores em vermelho indicam os resultados com significância estatística ($p<0,05$); SQ: Soma dos quadrados.

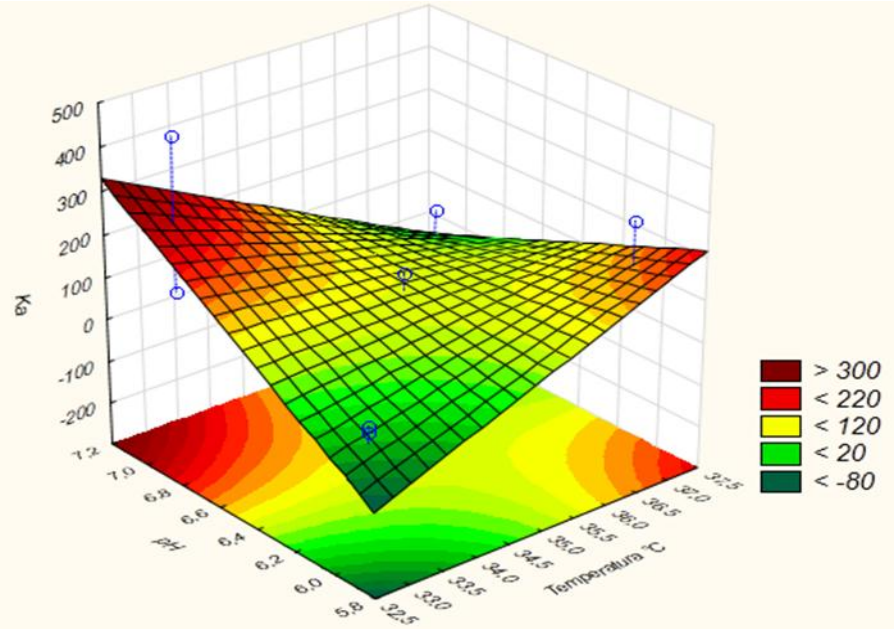

Figura 24: Superfície de resposta para K_a dos fatores pH e temperatura (°C) a 6 % de [Triton X-114].
Fonte: Autor

Com esses resultados é possível planejar outros experimentos para aumentar ainda mais o valor de K_a se for esse o objetivo. Em posse do resultado apresentado na **Erro! Fonte de referência não encontrada.**, os experimentos deveriam ser

conduzidos próximos das posições em que se obteve maior K_a (T°C↓ e pH↑ ou T°C↑ e pH↓). Porém, outros parâmetros deveriam ser avaliados antes de definir as próximas condições de experimento, assim como ter claro o objetivo da extração e sua finalidade.

5.6.1.2. *Fator de concentração - C_a*

Em alguns processos de extração é possível concentrar o produto alvo, o que normalmente é um ganho econômico. Reduz-se o volume a ser manipulado e permite um maior controle da concentração do produto. Adenovírus possui um tamanho aproximado de 100nm, relativamente grande para produtos biotecnológicos. Devido ao seu tamanho o efeito de exclusão pelo volume é pronunciado nos sistemas. Isso traz uma oportunidade para concentrar as partículas adenovirais, uma vez que as micelas constituintes da fase rica em micelas reduzem o volume livre para as partículas adenovirais (ROOSMALEN, VAN *et al.*, 2004). Uma opção seria reduzir o V_r, aumentando o volume da fase rica em micelas o que induziria as partículas virais para a fase diluída em tensoativo, concentrando-as. O V_r está inversamente relacionado à [Triton X-114], quanto maior o valor desse fator menor o V_r, menor o volume disponível para as partículas adenovirais, maior o fator de concentração do adenovirus. Isso foi observado nos sistemas, teoricamente é possível reduzir ainda mais os valores de V_r e obter C_a maiores, apenas aumentando a [Triton X-114]. A análise da Figura 25 demonstra que o efeito da [Triton X-114] é positivo e estatisticamente significativo ($p<0,05$). Outra opção para concentrar o adenovírus ainda mais além de aumentar a [Triton X-114] é escolher uma condição próxima à curva binodal onde a o V_r seria ainda menor. A Tabela 9 demonstra que o efeito da variável [Triton X-114] possui significância ($p<0,01$).

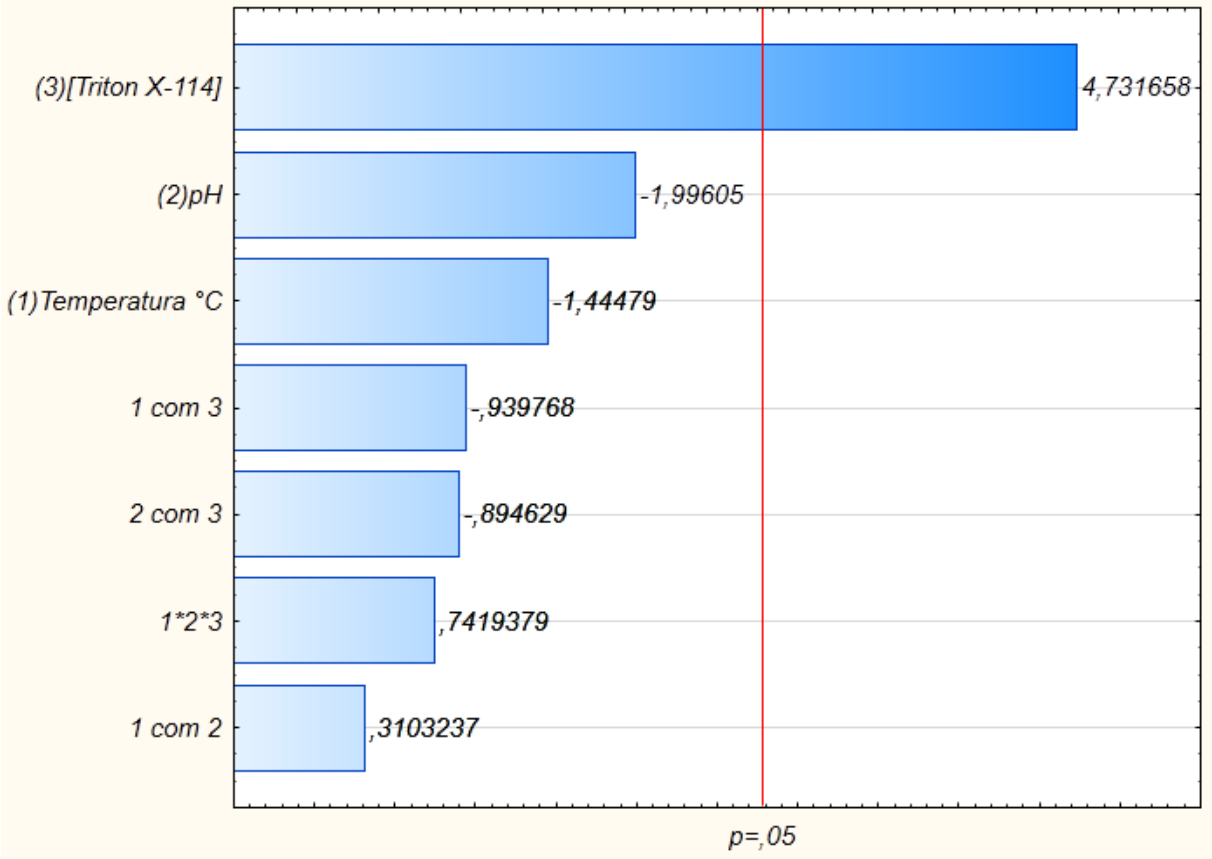

Figura 25: Gráfico de Pareto de efeitos padronizados; Variável: C_a.
Fonte: Autor
Cada barra indica um efeito. Interações estão indicadas com os pares e trios de números. 1: Temperatura (°C), 2: pH da suspensão viral, 3: [Triton X-114] em % (m/m).

Tabela 9: Análise de variância (ANOVA) dos efeitos no parâmetro C_a do adenovírus no SMDFA.

Fatores	SQ	Grau de Liberdade	Média dos quadrados	F	p
(1) T (°C)	0,09619	1	0,096195	2,08741	0,22203
(2) pH	0,18361	1	0,183606	3,98422	0,11664
(3) [Triton X-114]	1,03174	1	1,031740	22,38859	0,00909
1 com 2	0,00444	1	0,004438	0,09630	0,77181
1 com 3	0,04070	1	0,040699	0,88316	0,40054
2 com 3	0,03688	1	0,036883	0,80036	0,42155
1*2*3	0,02537	1	0,025368	0,55047	0,4993
Erro	0,18433	4	0,046083		
Total SQ	1,60326	11			

Ajuste R^2 = 0,88.
*Valores em vermelho indicam os resultados com significância estatística (p<0,05); SQ: Soma dos quadrados.

5.6.1.3. *Rendimento da recuperação do adenovirus na fase concentrada em micelas - Ya F_c (%)*

Em sistemas de duas fases aquosas é necessário definir a fase onde a biopartícula alvo será recuperada. De acordo com os resultados obtidos com o sistema de duas fases, os maiores rendimentos foram obtidos na fase diluída em tensoativo (Y_a F_d (%)), porém nenhum efeito significativo ($p<0,05$) foi observado nesse parâmetro. Entretanto, o Y_a F_c (%), apresentou efeito significativo como observado na **Erro! Fonte de referência não encontrada.**.

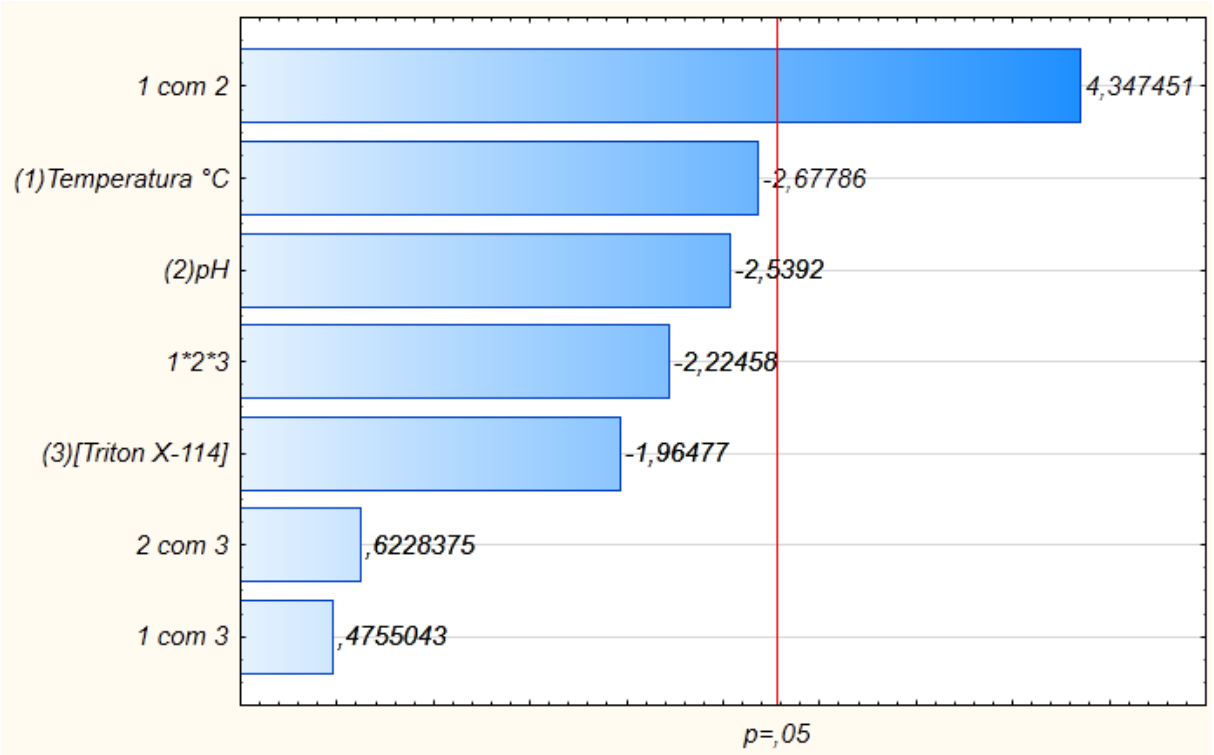

Figura 26: Gráfico de Pareto de efeitos padronizados; Variável: Y_a F_c (%).
Fonte: Autor
Cada barra indica um efeito. Interações estão indicadas com os pares e trios de números. 1: Temperatura (°C), 2: pH da suspensão viral, 3: [Triton X-114] em % (m/m).

A interação entre os fatores temperatura e pH foram importantes na recuperação das partículas adenovirais na fase concentrada em tensoativo (F_c). A análise da Figura 27 demonstra que o efeito é mais pronunciado para a interação no nível baixo dos fatores para o intervalo estudado. Os fatores temperatura e pH da suspensão viral apresentaram valores de *p* próximos a 0,05, o que é um indicativo de que possuem influência no rendimento na F_c. Eles apresentaram efeitos

negativos, indicando que quanto menor os valores desses fatores melhores os rendimentos.

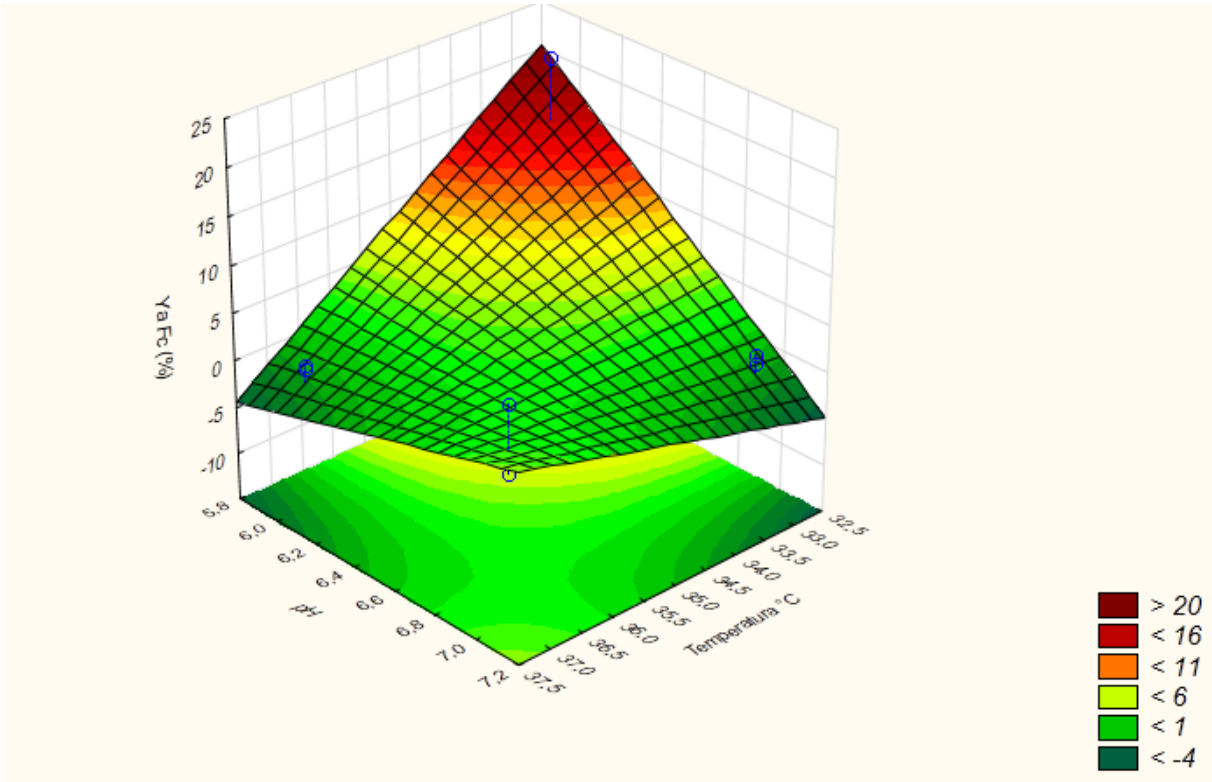

Figura 27: Superfície de resposta para $Y_a F_c$ (%) com os parâmetros pH e temperatura (°C).
Fonte: Autor

Seth *et al.* (1985) demonstraram que em pH próximo de 5, foi possível reverter a partição preferencial do adenovírus para a fase diluída (F_d) em tensoativo para a fase rica em tensoativo. Uma explicação para esse efeito seria a proximidade do pH do sistema com o pI das proteínas do capsídeo viral (Tabela 10), nesse ponto as partículas virais teriam baixa carga superficial e interagiriam com maior facilidade com a porção hidrofóbica dos tensoativos presentes na F_c. O mesmo pode estar acontecendo nos sistemas preparados em pH mais próximos a 5, a carga superficial de rede seria menor propiciando a interação com as micelas.

Tabela 10: pI teórico das principais proteínas do capsídeo viral.

Proteínas Capsídeo	Número de aminoácidos	pI teórico
Penton	571	5,58
Hexon	952	5,39

O efeito negativo da temperatura poderia ser explicado pelo aumento no grau de agitação das partículas, o que reduz o volume disponível para acomodar as partículas virais. O efeito de interação desses dois fatores seria a resultante dos dois fatores atuando em conjunto na partição das partículas adenovirais para a F_c.

Tabela 11: Análise de variância (ANOVA) dos efeitos no parâmetro Y_a F_c (%) do adenovírus em SMDFA.

Fator	SQ	Grau de Liberdade	Média dos quadrados	F	p
(1) T°C	73,2383	1	73,2383	7,17092	0,0554
(2) pH	65,8500	1	65,8500	6,44751	0,0640
(3) [Triton X-114]	39,4264	1	39,4264	3,86032	0,1209
1 com 2	193,0334	1	193,0334	18,90033	0,0122
1 com 3	2,3093	1	2,3093	0,22610	0,6592
2 com 3	3,9620	1	3,9620	0,38793	0,5671
1*2*3	50,5427	1	50,5427	4,94874	0,0902
Erro	40,8529	4	10,2132		
Total SQ	469,2149	11			

Ajuste R^2 = 0.91

*Valores em vermelho indicam os resultados com significância estatística ($p<0,05$); SQ: Soma dos quadrados.

5.6.1.4. *Rendimento da recuperação da potência viral - RPv (%)*

Algumas aplicações do adenovírus exigem que a capacidade de infectar células seja mantida, mesmo após o processo de extração. Para avaliar o efeito do sistema sobre as partículas infecciosas do adenovírus o R_{Pv} (%) foi calculado. Esse parâmetro permite avaliar a infectividade viral, pois relaciona a concentração de partículas virais quantificadas após o processo de infecção com a concentração de partículas virais no inicio do teste.

Portanto, com um número de partículas virais infecciosas elevado, é esperado que a relação P_v fosse elevada, pois um maior número de infecções ocorrerá, aumentando a produção de novas partículas. Isso não é necessariamente verdadeiro, pois em algumas condições de alta concentração de partículas infecciosas é possível que o número de células seja limitante. Então dois testes com concentrações elevadas e diferentes podem não ser distinguidos. Para evitar essa possibilidade os testes foram preparados em placas de 96 poços em diluições diferentes (Figura 9) e o valor de P_v comparado entre as diluições corrigido o fator de diluição. Em todos os valores utilizados não houve diferença estatística entre as diluições indicando que essa condição não foi atingida e, portanto, os resultados não

estão sobre esse efeito. Mesmo que em algum teste tenha ocorrido esse efeito e tenha sido mascarado pela variação da técnica, terá baixa influência no valor médio, pois o resultado é a média das quatro diluições.

O principal efeito para esse parâmetro foi o pH da suspensão viral (Figura 28 e Tabela 12). O valor positivo desse efeito indica que quanto maior o pH maior o R_{Pv} (%). Essa observação é verdadeira para o intervalo estudado, porém em pH muito elevados é possível que ocorra a inativação das partículas virais infecciosas. O cultivo do vírus é feito em pH próximos do fisiológico, e é esperado que o vírus tenha maior estabilidade próximo a esse pH (DICHTELMÜLLER *et al.*, 2012).

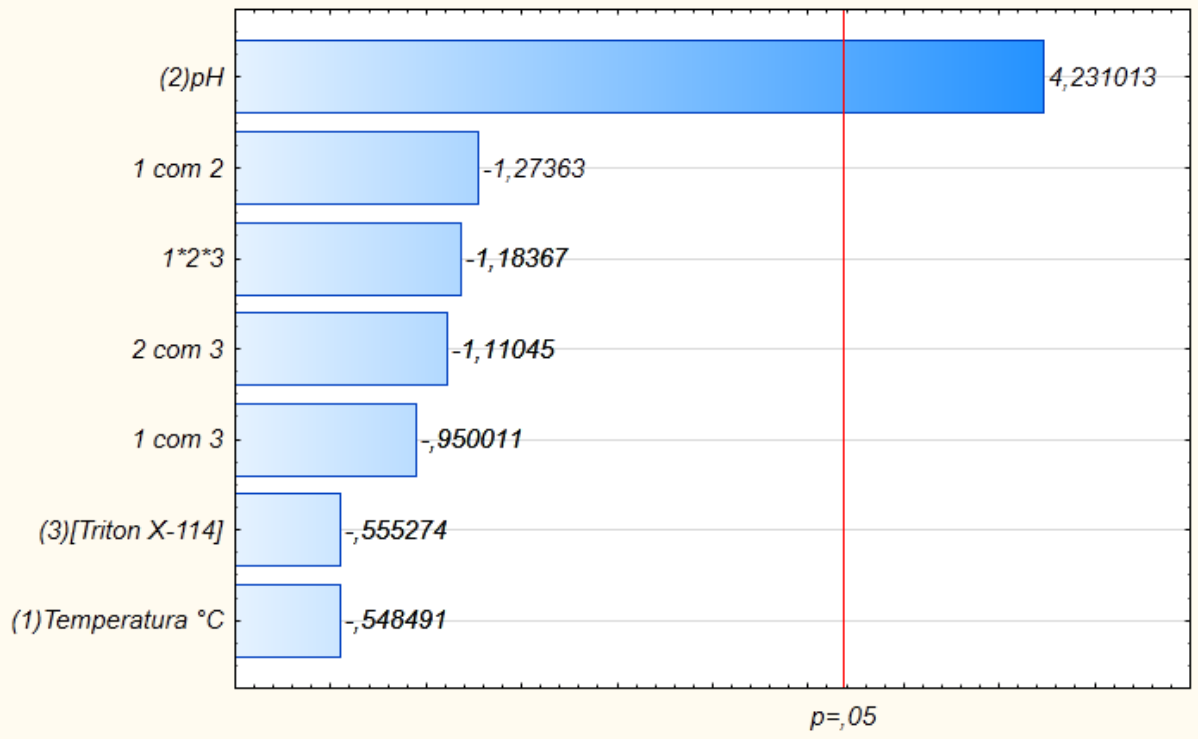

Figura 28: Gráfico de Pareto de efeitos padronizados; Variável R_{Pv} (%).
Fonte: Autor

Cada barra indica um efeito. Interações estão indicadas com os pares e trios de números. 1: Temperatura (°C), 2: pH da suspensão viral, 3: [Triton X-114] em (%m/m).

Tabela 12: Análise de variância (ANOVA) dos efeitos no parâmetro R_{Pv} (%) do adenovírus no SMDFA.

Fator	SQ	Grau de Liberdade	Média dos quadrados	F	p
(1) T°C	414,1	1	414,15	0,30084	0,621536
(2) pH	24643,6	1	24643,63	17,90147	0,024156
(3) [Triton X-114]	424,5	1	424,45	0,30833	0,617426
1 com 2	2233,1	1	2233,06	1,62213	0,292517
1 com 3	1242,4	1	1242,43	0,90252	0,412193
2 com 3	1697,5	1	1697,52	1,23310	0,347804
1*2*3	1928,8	1	1928,77	1,40108	0,321790
Erro	4129,9	3	1376,63		
Total SQ	102534,7	10			

Ajuste R^2 = 0.96

*Valores em vermelho indicam os resultados com significância estatística (p<0,05); SQ: Soma dos quadrados.

Os valores de R_{Pv} (%) foram relativamente mais baixos no pH 6 quando comparado com os outros pH testados, como esperado, pensando na estabilidade da partícula viral frente ao pH do meio. Em alguns ensaios (C e D) os valores foram muito superiores a 100%, isso indica que o sistema possui capacidade de concentrar partículas infecciosas na fase diluída F_d. Para melhor avaliar essa possibilidade foi avaliado o parâmetro $R_{Pv\varphi}$ (%), que será discutido abaixo.

5.6.1.5. *Recuperação da potência viral específica - $R_{Pv\varphi}$ (%)*

A potência viral específica ($P_{v\varphi}$) é um parâmetro em que relaciona a potência viral com a concentração de partículas adenovirais totais, portanto, se a concentração de partículas infecciosas aumenta em relação a concentração de partículas virais totais, essa mudança refletirá em $P_{v\varphi}$ aumentando o seu valor. Para compreender a extensão dessa mudança, o $R_{Pv\varphi}$ foi calculado, pois ele relaciona o $P_{v\varphi}$ da amostra teste com o da suspensão viral. Resultados acima de 100 % indicam aumento na relação e, portanto extração seletiva das partículas virais infecciosas.

É desejado em alguns processos de extração aumentar essa relação para atingir critérios de agências fiscalizadoras. O FDA (Food and Drug Administration) preconiza o uso de no máximo uma razão de 30 partículas adenovirais para 1 unidade infectante. Os resultados encontrados demonstraram que alguns ensaios aumentaram a relação $P_{v\varphi}$, atingindo valores como 1400% (Ensaio D). Isso indica que partículas adenovirais não infecciosas tem maior afinidade para a fase concentrada (F_c) do que as partículas infecciosas.

A análise do planejamento demonstrou que esse parâmetro é influenciado por diversos fatores (Figura 29 e Tabela 13): temperatura, [Triton X-114], interação entre pH e [Triton X-114] e interação entre pH e temperatura.

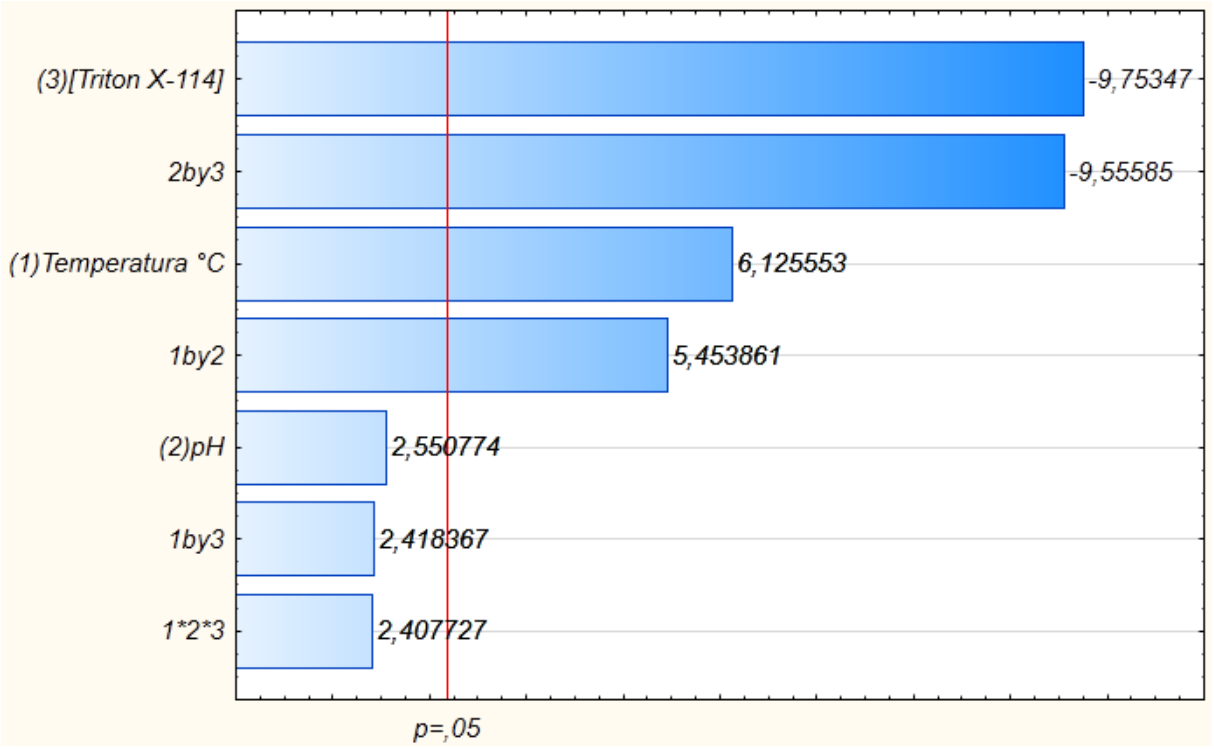

Figura 29: Gráfico de Pareto de efeitos padronizados; Variável: $R_{Pv\phi}$ (%).
Fonte: Autor

Cada barra indica um efeito. Interações estão indicadas com os pares e trios de números. 1: Temperatura (°C), 2: pH da suspensão viral, 3: [Triton X-114] em (%m/m).

Tabela 13: Análise de variância (ANOVA) dos efeitos no parâmetro $R_{Pv\phi}$ (%) do adenovírus em SMDFA.

Fator	SQ	Grau de Liberdade	Média dos quadrados	F	p
(1) T°C	138774	1	138774,3	37,52240	0,008747
(2) pH	24064	1	24063,7	6,50645	0,083886
(3) [Triton X-114]	351833	1	351833,1	95,13018	0,002290
1 com 2	110009	1	110008,6	29,74460	0,012110
1 com 3	21630	1	21630,3	5,84850	0,094307
2 com 3	337720	1	337720,1	91,31422	0,002431
1*2*3	21440	1	21440,4	5,79715	0,095211
Erro	11095	3	3698,4		
Total SQ	1814208	10			

Ajuste R^2 = 0,994
*Valores em vermelho indicam os resultados com significância estatística (p<0,05); SQ: Soma dos quadrados.

O efeito do [Triton X-114] foi negativo, indicando que quanto maior a concentração de Triton X-114 menor o $R_{Pv\varphi}$. Portanto para obter elevados valores de potência viral específica esse fator deve ser mantido baixo.

Outro fator importante foi a temperatura (°C) do ensaio, de acordo com os resultados obtidos, quanto maior a temperatura maior os valores de $R_{Pv\varphi}$. O aumento da temperatura promove um aumento na densidade de tensoativo na fase concentrada (F_c), teoricamente isso reduziria o espaço médio entre as micelas, restringindo por tamanho as partículas com capacidade de coexistirem na mesma fase que as micelas. Se a inativação dos adenovírus estiver ligada com a perda das fibras (Figura 1), isso implicaria numa redução do volume hidrodinâmico das partículas adenovirais e poderia explicar esses resultados.

O $R_{Pv\varphi}$ também foi influenciado pela interação entre pH e [Triton X-114] negativamente, ou seja, maiores valores podem ser obtidos se utilizado valores de pH e [Triton X-114] em níveis contrários, ou seja, um nível alto e o outro em nível baixo na faixa estudada. Outra interação significativa foi entre temperatura e pH de forma positiva, portanto valores elevados de $R_{Pv\varphi}$ são encontrados quando esses dois fatores estão no mesmo nível, para a faixa estudada.

5.6.2. Análise estatística – Planejamento 2

Os resultados obtidos nos ensaios do Planejamento 2 estão resumidos na Tabela 14. Esse planejamento não recebeu análise de infectividade, porém uma nova informação foi adicionada, proteínas totais, para todos os ensaios. Esse planejamento foi realizado com um tempo de extração de aproximadamente 24 h. Todos os parâmetros foram avaliados utilizando o software STATISTICA 10.

Tabela 14: Resultados do Planejamento 2, calculados pelo método de C_t

Ensaio	T (°C)	pH	[T X114] (%m,m)	V_r	K_a	C_a	Y_a F_c (%)	Y_a F_d (%)	Y_p	F_p
A2	33,0	6,0	1,0	13,3	0,54	0,70	9,21	66,12	71,68	0,92
B2	37,0	6,0	1,0	15,7	72,24	0,79	0,07	75,10	73,99	1,02
C2	33,0	7,0	1,0	13,3	51,45	0,57	0,08	53,37	75,90	0,70
D2	37,0	7,0	1,0	15,7	38,79	0,63	0,10	60,02	78,23	0,77
E2	33,0	6,0	11,0	0,6	17,51	1,60	6,38	68,46	47,17	1,45
F2	37,0	6,0	11,0	0,8	105,02	1,37	0,81	69,26	45,95	1,51
G2	33,0	7,0	11,0	0,7	25,68	2,01	5,29	90,52	50,38	1,80
H2	37,0	7,0	11,0	1,3	462,88	1,01	0,11	63,86	59,05	1,08
I2	35,0	6,5	6,0	1,9	337,23	0,81	0,09	56,97	61,71	0,92
J2	35,0	6,5	6,0	1,9	555,15	1,37	0,09	96,06	67,70	1,42
K2	35,0	6,5	6,0	1,9	409,14	1,02	0,09	71,79	64,76	1,11
L2	35,0	6,5	6,0	1,9	483,45	1,25	0,09	87,90	70,00	1,26

T: Temperatura (°C); V_r: Razão volumétrica; K_a: Coeficiente de partição; Y_a: Rendimento; F_c: Fase rica em micelas; F_d: Fase pobre em micelas; B_p: Balanço de partículas adenovirais; C_a: Fator de concentração; Y_p: rendimento de recuperação de proteínas totais; F_p: Fator de purificação.

5.6.2.1. *Fator de concentração - C_a*

As mesmas conclusões obtidas no primeiro planejamento podem ser feitas para os resultados de C_a (Figura 30). O único fator significante ($p<0,01$) foi a [Triton X-114] (Tabela 15). Portanto, o tempo de extração não influenciou o efeito geral entre os dois tempos de extração para esse parâmetro.

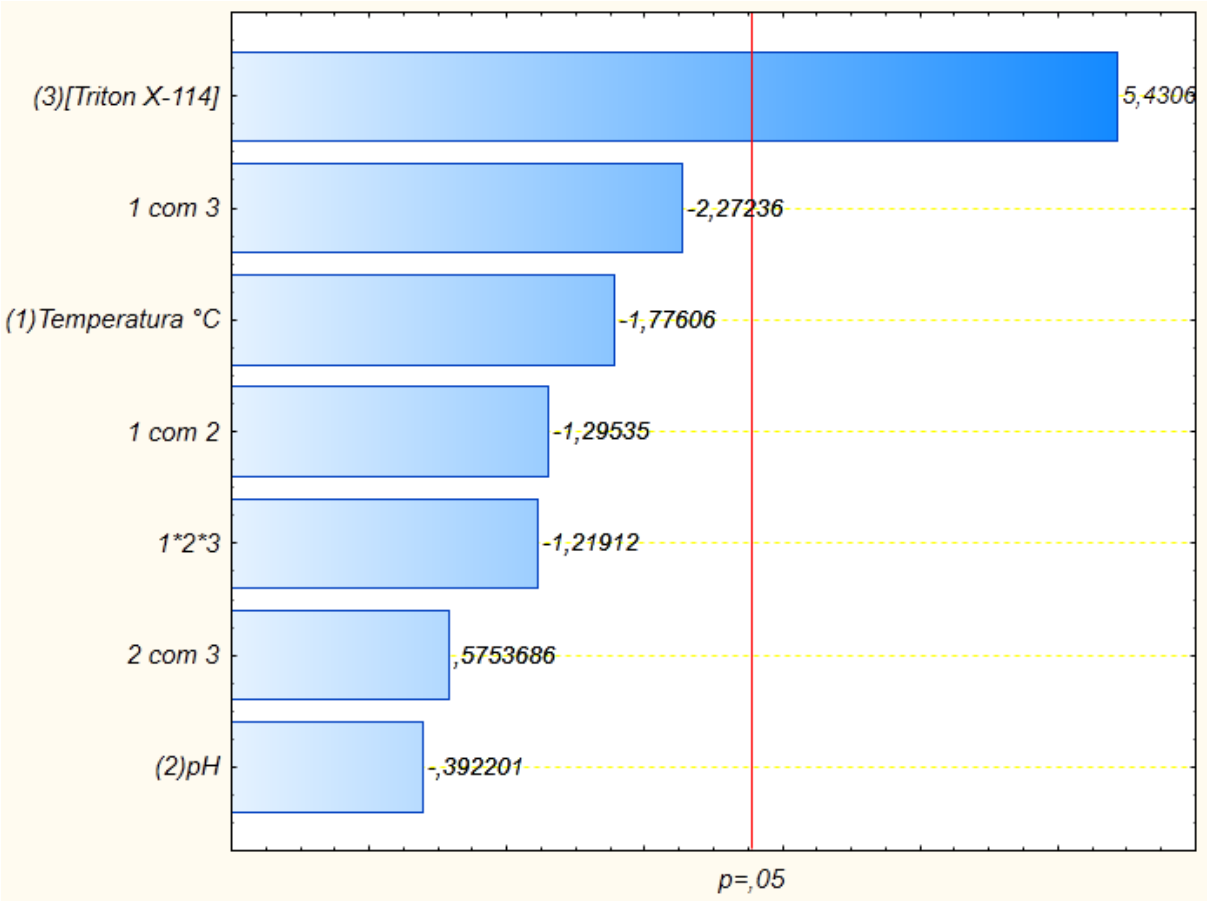

Figura 30: Gráfico de Pareto de efeitos padronizados; Variável C_a
Fonte: Autor
Cada barra indica um efeito. Interações estão indicadas com os pares e trios de números. 1: Temperatura (°C), 2: pH da suspensão viral, 3: [Triton X-114] em % (m/m).

Porém comparando diretamente os resultados observa-se uma tendência de que com um maior tempo de extração, ocorra um maior valor de C_a. Através de uma análise de variância (ANOVA) obtivemos um valor significante para essa tendência (*$p<0,006$).*

Tabela 15: Análise de variância (ANOVA) dos efeitos no parâmetro C_a do adenovírus no SMDFA.

Fator	SQ	Grau de Liberdade	Média dos quadrados	F	p
(1) T°C	0,031571	1	0,031571	0,9352	0,3883
(2) pH	0,037531	1	0,037531	1,1118	0,3512
(3) [Triton X-114]	0,737307	1	0,737307	21,8410	0,0095
1 com 2	0,079984	1	0,079984	2,3693	0,1986
1 com 3	0,083201	1	0,083201	2,4646	0,1915
2 com 3	0,018661	1	0,018661	0,5528	0,4985
1*2*3	0,068918	1	0,068918	2,0415	0,2263
Erro	0,135032	4	0,033758		
Total SQ	1,192204	11			

Ajuste R^2 = 0,89

*Valores em vermelho indicam os resultados com significância estatística ($p<0,05$); SQ: Soma dos quadrados.

Esses resultados poderiam ser explicados pela presença de domínios da fase pobre em micelas (F_d) na fase rica em micelas (F_c) e vice-versa. Com tempos menores de extração há um maior número de domínios em ambas as fases, que gradativamente reduzem com o tempo, como pode ser observado pela redução da turbidez nas fases. Esse efeito de domínios nas fases pode ser observado por uma maior turbidez nas fases do sistema com menor tempo de extração quando comparada com as fases do sistema com maior tempo de extração.

A presença de domínios F_d na fase rica em micelas permite maior partição do adenovírus para essa fase, reduzindo os valores de C_a, por parte das partículas adenovirais estarem na fase rica em micelas (F_c).

5.6.2.2. *Rendimento de recuperação de Adenovírus na fase concentrada em micelas - Y_a F_c*

O principal efeito no rendimento na fase rica em micelas (F_c) foi a temperatura, diferentemente do Planejamento 1, em que o principal fator foi a interação entre temperatura e pH. O efeito obtido foi negativo o que demonstra que quanto maior a temperatura menor será o rendimento nessas fases. Isso pode novamente ser explicado pelo efeito de exclusão pelo volume, uma vez que com o aumento da temperatura, induz aumento na concentração de tensoativo na F_c e com isso a concentração de micelas. Esse aumento reduz o volume disponível para partição das partículas virais, reduzindo o rendimento nessa fase (Figura 31).

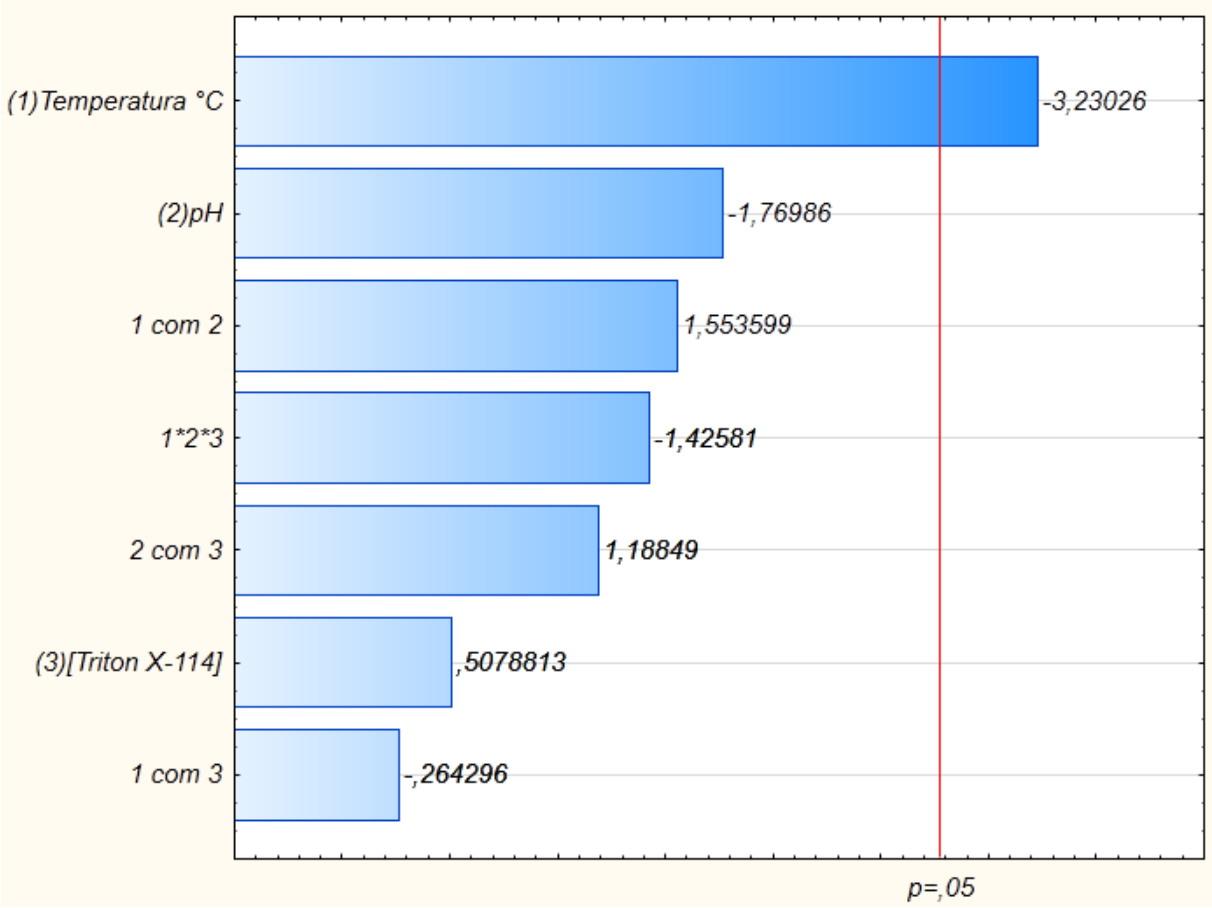

Figura 31: Gráfico de Pareto de efeitos padronizados; Variável: Y_aF_c.
Fonte: Autor
Cada barra indica um efeito. Interações estão indicadas com os pares e trios de números. 1: Temperatura (°C), 2: pH da suspensão viral, 3: [Triton X-114] em % (m/m).

Tabela 16: Análise de variância (ANOVA) dos efeitos do parâmetro Y_aF_c do Adenovirus no SMDFA.

Fator	SQ	Grau de Liberdade	Média dos quadrados	F	p
(1) T°C	49,3720	1	49,37195	10,43456	0,0320
(2) pH	14,8212	1	14,82117	3,13240	0,1515
(3) [Triton X-114]	1,2205	1	1,22048	0,25794	0,6383
1 com 2	11,4205	1	11,42047	2,41367	0,1952
1 com 3	0,3305	1	0,33051	0,06985	0,8046
2 com 3	6,6834	1	6,68339	1,41251	0,3004
1*2*3	9,6189	1	9,61895	2,03293	0,2271
Erro	18,9263	4	4,73158		
Total SQ	112,3932	11			

Ajuste R^2 = 0,57
*Valores em vermelho indicam os resultados com significância estatística (p<0,05); SQ: Soma dos quadrados.

5.6.2.3. *Rendimento de recuperação de proteínas totais - $Y_{p\ (\%)}$*

Em processos de extração e purificação é importante acompanhar a remoção dos contaminantes. Na produção de adenovírus utilizasse células humanas e soro fetal bovino, ambos possuem proteínas em sua composição (contaminante). Para avaliar o comportamento de extração dessas proteínas de uma forma geral, foi realizada a quantificação das proteínas totais. A suspensão viral possuía em média 1,226 g/L de proteínas. Uma estimativa de quanto dessa proteína é relacionada ao vírus resultou em 0,3 (% m/m), seria ideal que o sistema separasse as proteínas das partículas adenovirais.

O rendimento da extração de proteínas foi determinado na fase diluída em tensoativo (F_d). Em um processo de purificação, seria ideal que obtivéssemos baixos rendimentos nessa fase, uma vez que é a fase preferencial de recuperação do adenovírus. Porém foram observados valores relativamente elevados (~75%) para alguns ensaios.

O principal efeito no Y_p foi a [Triton X-114] que influenciou negativamente a extração das proteínas (Figura 33 e Tabela 17). Esse resultado pode estar relacionado com a observação feita durante os experimentos de um precipitado na interfase (Figura 32).

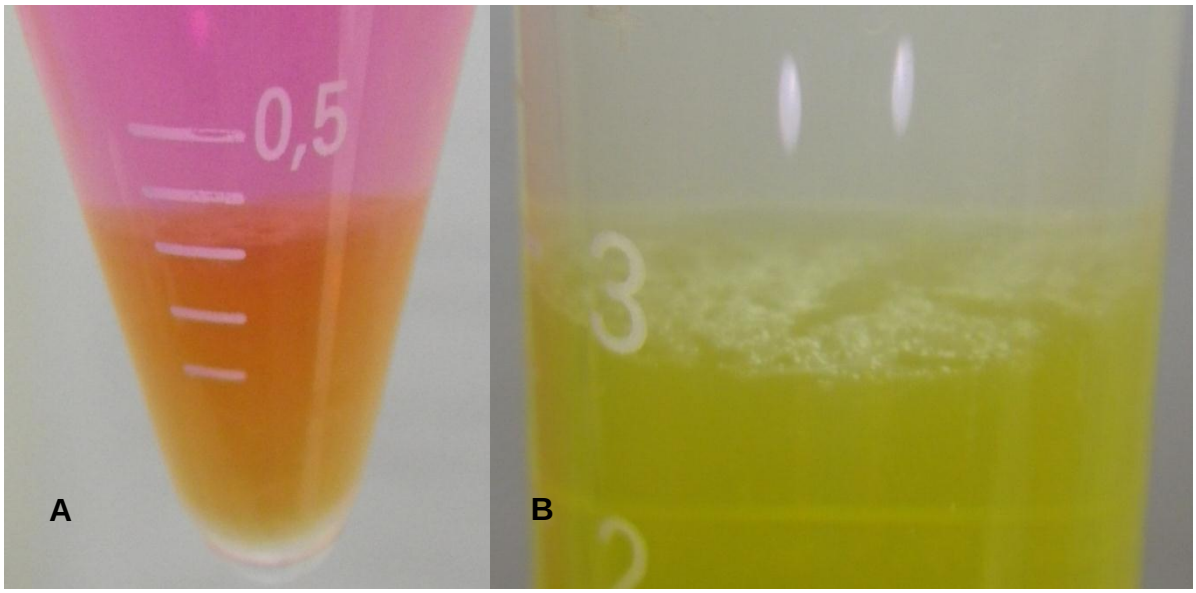

Figura 32: Fotos exemplo de precipitado na interfase.
Fonte: Autor
A: Sistema formado com 1 % (m/m) de Triton X-114, suspensão viral em pH 7,0; **B**: Sistema formado com 11 % de Triton X-114, suspensão viral em pH 5,0.

É possível que parte do material precipitado sejam restos celulares e proteínas presentes na suspensão viral e que para sistemas com maior [Triton X-114] as proteínas precipitem em maior proporção, explicando os resultados de Y_p, menores para [Triton X-114] maiores. Outra explicação seria que o volume da F_c está relativamente maior nos sistemas com maior [Triton X-114]. Um volume maior comporta mais proteínas.

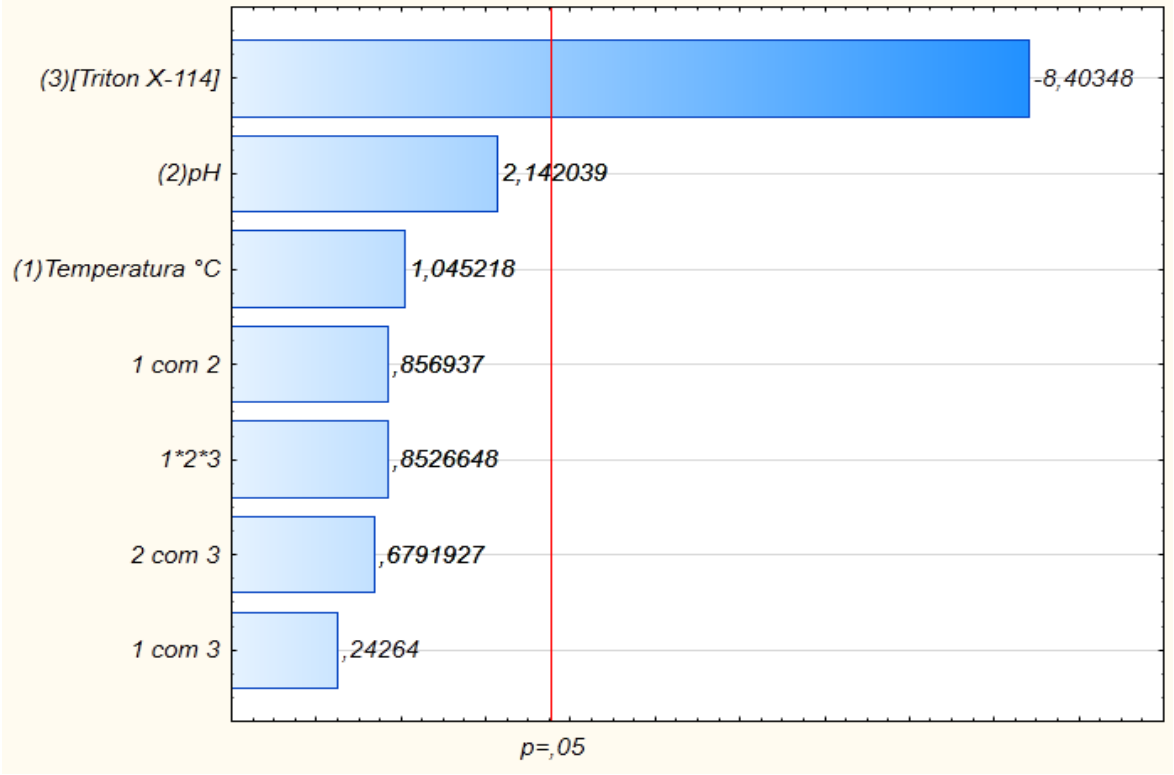

Figura 33: Gráfico de Pareto de efeitos padronizados; Variável: Y_p (%).
Fonte: Autor
Cada barra indica um efeito. Interações estão indicadas com os pares e trios de números. 1: Temperatura (°C), 2: pH da suspensão viral, 3: [Triton X-114] em % (m/m).

Tabela 17: Análise de Variância (ANOVA) dos efeitos no parâmetro Y_p (%) do adenovírus no SMDFA.

Fator	SQ	Grau de Liberdade	Média dos quadrados	F	p
(1) T°C	18,284	1	18,284	1,09248	0,3549
(2) pH	76,793	1	76,793	4,58833	0,0989
(3) [Triton X-114]	1181,904	1	1181,904	70,61844	0,0011
1 com 2	12,290	1	12,290	0,73434	0,4398
1 com 3	0,985	1	0,985	0,05887	0,8202
2 com 3	7,721	1	7,721	0,46130	0,5343
1*2*3	12,168	1	12,168	0,72704	0,4419
Erro	66,946	4	16,736		
Total SQ	1377,091	11			

Ajuste R^2 = 0,87
*Valores em vermelho indicam os resultados com significância estatística (p<0,05); SQ: Soma dos quadrados.

5.6.2.4. *Fator de purificação - Fp*

Encontrou-se relação direta entre a [Triton X-114] e o fator de purificação (Figura 34). Esse resultado está relacionado com o maior fator concentração das partículas adenovirais em maiores [Triton X-114] e com o comportamento contrário em relação às proteínas totais, como observado nos parâmetros em C_a e Y_p, respectivamente.

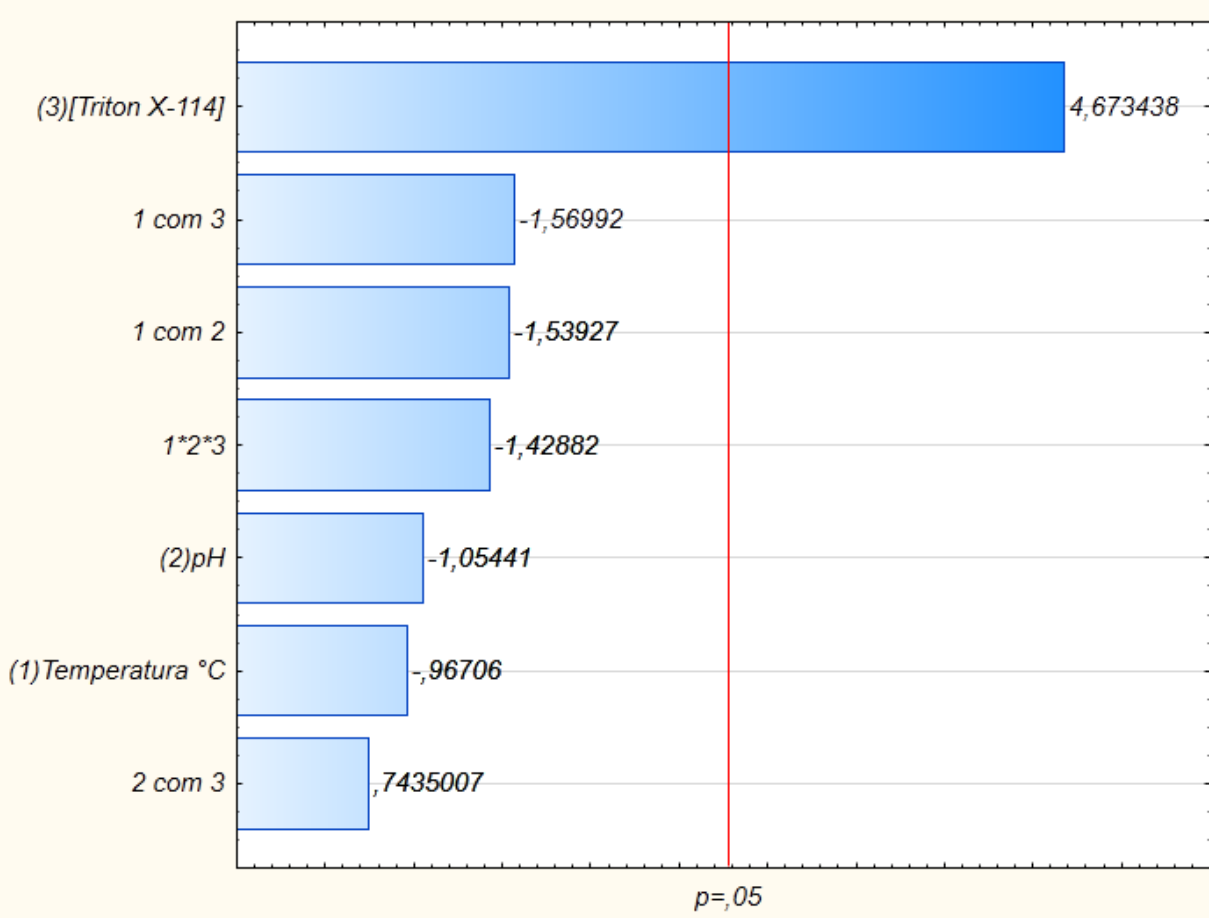

Figura 34: Gráfico de Pareto de efeitos padronizados; Variável: F_p
Fonte: Autor
Cada barra indica um efeito. Interações estão indicadas com os pares e trios de números. 1: Temperatura (°C), 2: pH da suspensão viral, 3: [Triton X-114] em % (m/m).

A análise de variância (ANOVA) resultou em um valor de *p* para o efeito da [Triton X-114] menor do que 0,01, como podemos observar abaixo (Tabela 18). Os outros efeitos não foram significativos. Esses resultados indicam que ao aumentarmos as [Triton X-114] podemos aumentar os valore de F_p.

Tabela 18: Análise de variância (ANOVA) do F_p.

Fator	SQ	Grau de Liberdade	Média dos quadrados	F	p
(1) T°C	0,031571	1	0,031571	0,93521	0,3883
(2) pH	0,037531	1	0,037531	1,11178	0,3512
(3) [Triton X-114]	0,737307	1	0,737307	21,84102	0,0095
1 com 2	0,079984	1	0,079984	2,36935	0,1986
1 com 3	0,083201	1	0,083201	2,46464	0,1915
2 com 3	0,018661	1	0,018661	0,55279	0,4985
1*2*3	0,068918	1	0,068918	2,04153	0,2263
Erro	0,135032	4	0,033758		
Total SQ	1,192204	11			

Ajuste R^2 = 0,67
*Valores em vermelho indicam os resultados com significância estatística ($p<0,05$); SQ: Soma dos quadrados.

Os valores de F_p foram relativamente baixos, quando comparados com outros métodos de purificação (FORCIC *et al.*, 2011). Porém, há poucos estudos sobre extrações de Adenovirus, quando comparamos com biopartículas como anticorpos. Além disso, o SMDFA pode ser projetado para integrar um processo de extração atuando como uma etapa preliminar, removendo outros contaminantes (i.e não proteicos).

Outro ponto a ser destacado, é o fato de que os resultados obtidos foram para uma suspensão viral sem nenhuma forma de pré-tratamento, além da correção do pH. Portanto, integra se a etapa de clarificação com a de extração dispensando o uso de métodos como centrifugação para clarificar a suspensão, além de realizar uma pré-purificação para alguns dos ensaios.

5.7. AUMENTO DE ESCALA

Os experimentos dos planejamentos foram todos realizados com peso total de 5,00g. Processos industriais visando produzir partículas adenovirais podem exigir quantidades muito superiores a essas. Em ordem para estimar se os valores encontrados em sistemas com menor massa são aplicáveis a sistemas maiores, foi realizado o teste de aumento de escala.

Devido à dificuldade de produzir as suspensões virais apenas parte dela foi destinada a esse teste. O teste foi realizado aumentando a escala em

aproximadamente 3X e 13X. Os sistemas foram preparados com 3g, 10g e 40g. Os resultados estão resumidos na Tabela 19.

Tabela 19: Resultados do aumento de escala.

Ensaio	T (°C)	pH	[T X114](%m,m)	V_r	K_a	Y_a F_c (%)	Y_a F_d (%)	B_p	Y_p	F_p
AE1	37,0	6,0	11,0	0,7	442	0,11	30,98	31,09	46,23	0,67
AE2	37,0	6,0	11,0	0,7	593	0,08	29,77	29,84	44,35	0,67
AE3	37,0	6,0	11,0	0,7	2573	0,02	31,85	31,87	42,22	0,75
AE4	37,0	6,0	11,0	0,7	4166	0,01	40,55	40,57	42,60	0,95
AE5	37,0	6,0	11,0	0,7	2093	0,03	43,77	43,80	45,44	0,96
AE6	37,0	6,0	11,0	0,7	1547	0,04	49,02	49,06	49,90	0,98
AE7	37,0	6,0	11,0	0,7	2744	0,02	34,70	34,72	59,73	0,58

A análise de variância demonstrou que para nenhum dos parâmetros avaliados houve diferença significativa ($p<0,05$). O resultado com valor de *p* mais baixo foi para o parâmetro Y_a F_d. A Figura 35 apresenta o resultado para esse parâmetro.

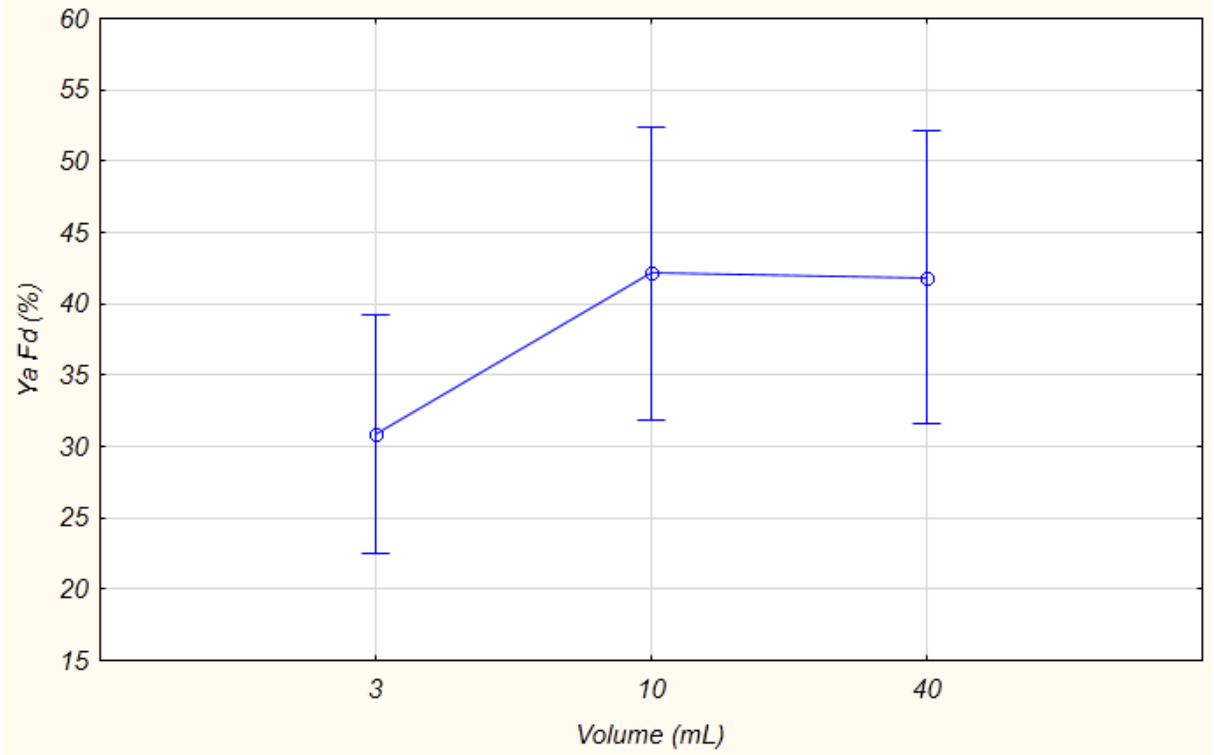

Figura 35: Y_a F_d (%) versus volume.
Fonte: Autor
F(2,4)=3,8760, p=0,11585; as barras verticais denotam o intervalo de confiança de 0,95.

Os resultados obtidos indicam que o sistema mantém as principais características quando aumentado sua escala. Porém o intervalo testado é muito pequeno quando comparado com a massa de processos industriais e extrapolar esses resultados poderia levar a falhas. Afim de melhor avaliar o escalonamento do

SMDFA, mais testes devem ser realizados utilizando maiores massas. O limitante nesse teste é a capacidade de produção de adenovírus, que é baixa em escala de laboratório. Uma solução proposta refere-se ao uso de partículas de fácil obtenção e com mesma massa molecular nos estudos. Estudos utilizando essas partículas mímicas permitiram observar os efeitos relacionados ao volume, porém importantes fatores como conservação da infectividade viral não seriam avaliados (BRAAS, G. M.; WALKER, S G; *et al.*, 2000).

5.8. COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS C_T E CY0 DE QUANTIFICAÇÃO POR PCRq

Os resultados de PCRq foram calculados utilizando dois métodos diferentes. O método C_t utiliza uma linha de amarração que define um nível de fluorescência padrão para todas as reações, quando atingido, é registrado o ciclo fracionário em que essa condição foi satisfeita para cada reação. Em ordem para quantificar as amostras uma diluição seriada permitiu correlacionar os valores de Ct com concentrações conhecidas de DNA. Ao realizar as quantificações dessa forma assumimos que as condições de reação entre as amostras e o padrão são as mesmas. Porém, por se tratar de amostras biológicas, inibidores podem estar presentes e alterar a eficiência das reações (GUESCINI *et al.*, 2008). Por esse motivo o método Cy0 foi testado. Os resultados não indicaram diferença na quantificação utilizando nenhum dos métodos, o que indica a ausência de inibidores nas reações.

O protocolo de extração e quantificação do DNA foi exaustivamente alterado para possibilitar a melhor quantificação possível. Alguns cuidados foram tomados para evitar inibições nas reações, como o teste de diferentes diluições da amostra para determinar a melhor diluição de preparo das reações. Esse cuidado pode ser a causa da ausência de interferentes nas reações.

Outra característica avaliada foi a precisão das duas metodologias expressa em DPR (Desvio padrão relativo). Utilizando os pontos centrais como replicatas, avaliou-se o DPR para os diferentes parâmetros calculados com as duas metodologias, nos dois planejamentos Tabela 20 e Tabela 21, respectivamente.

Os resultados apresentados nas tabelas 20 e 21 indicam que o método Cy0 é mais preciso, para quantificações mais elevadas de DNA. Os parâmetros Y_a F_d (%), B_p, C_a, R_{Pv} (%) e $R_{Pv\varphi}$ (%) foram determinados com concentrações relativamente elevadas de DNA, justamente os resultados em que o Cy0 foi mais preciso.

Tabela 20: Resultado de desvio padrões relativo para diferentes parâmetros calculados pelos métodos de C_t e de Cy0, Planejamento 1.

	Ka	Ya Fc (%)	Ya Fd (%)	Bp	Ca	Rpv (%)	Rpvϕ (%)
DPR (%): Ct	132,6	87,9	10,1	8,8	10,1	20,4	29,1
DPR (%): Cy0	126,2	80,8	14,4	14,4	14,4	23,5	35,7
DPR (%): Ct-Cy0	6,3	7,1	-4,2	-5,6	-4,2	-3,1	-6,6

DPR = Desvio padrão relativo (%).

Tabela 21: Resultados de desvio padrões relativo para diferentes parâmetros calculados pelos métodos de C_t e de Cy0, Planejamento 2.

	Ka	Ya Fc (%)	Ya Fd (%)	Ca	Fp
DPR (%): Ct	21,06422	3,08752	22,21594	22,21594	17,95358
DPR (%): Cy0	21,57565	4,897879	20,72247	20,64126	17,07998
DPR (%): Ct-Cy0	-0,51143	-1,81036	1,493472	1,574678	0,873605

DPR = Desvio padrão relativo (%).

A explicação para essa observação se deve a metodologia de ajuste do método Cy0. É realizada uma regressão não linear aos resultados experimentais e é esperado que para reações com menor concentração de DNA o método seja menos preciso, pelo explicado abaixo.

Em baixas concentrações de DNA pouca informação sobre a fluorescência máxima (F_m) é obtida, o que torna a regressão menos precisa e por isso o método C_t foi relativamente mais preciso para os parâmetros K_a, e Y_a F_c (%). Esses dois parâmetros utilizam a quantificação da concentração de partículas virais na fase concentrada, que foi geralmente baixa para todos os ensaios, tornando a precisão do método Cy0 menor para eles.

5.8.1. Análise estatística – Planejamento 1, calculado com o método Cy0

Os resultados obtidos utilizando o método Cy0 foram analisados da mesma maneira que os resultados de Ct e algumas diferenças nos resultados foram encontradas e estão discutidas abaixo. Os resultados dos parâmetros estão resumidos na Tabela 22.

Tabela 22: Resultados do Planejamento 1, calculados pelo método Cy0.

Ensaio	T (°C)	pH	[T X114] (%m,m)	V_r	Ka	Ya Fc (%)	Ya Fd (%)	Bp	Ca	Pv	Rpv (%)	Pvϕ	Rpvϕ (%)
A	33,0	6,0	1,0	15,67	0,12	21,41	39,71	61,12	0,42	236,88	19,75	344,47	42,13
B	37,0	6,0	1,0	19,00	122,21	0,02	40,08	40,09	0,42	523,74	43,66	806,67	98,65
C	33,0	7,0	1,0	15,67	491,37	0,00	30,70	30,70	0,32	3840,66	320,16	11418,94	1396,42
D	37,0	7,0	1,0	19,00	0,14	7,27	19,19	26,45	0,20	4101,85	341,93	11990,11	1466,27
E	33,0	6,0	11,0	0,18	14,68	9,88	25,59	35,47	1,52	415,32	34,62	177,94	21,76
F	37,0	6,0	11,0	0,61	290,52	0,26	45,59	45,85	1,07	962,13	80,20	605,38	74,03
G	33,0	7,0	11,0	0,43	104,42	0,92	41,15	42,07	1,22	x	x	x	x
H	37,0	7,0	11,0	0,61	77,61	0,71	33,60	34,30	0,79	1235,23	102,97	1152,22	140,91
I	35,0	6,5	6,0	2,33	27,82	0,92	59,80	60,72	0,80	1956,09	163,06	1633,38	199,75
J	35,0	6,5	6,0	2,33	15,45	1,71	61,66	63,37	0,83	2462,67	205,29	1818,68	222,41
K	35,0	6,5	6,0	2,33	147,32	0,21	73,68	73,89	0,99	1475,46	122,99	929,00	113,61
L	35,0	6,5	6,0	2,33	7,66	3,41	61,03	64,44	0,82	2062,05	171,89	1197,50	146,44

T: Temperatura (°C); $V_{r:}$ Razão volumétrica; K_a: Coeficiente de partição; Y_a: Rendimento; $F_{c:}$ Fase rica em micelas; F_d: Fase pobre em micelas; B_p: Balanço de partículas adenovirais; $C_{a:}$ Fator de concentração; $P_{v:}$ Potência viral; $P_{v\varphi}$: Potência viral específica; R: Recuperação (%).

5.8.1.1. *Fator de concentração - Ca*

O parâmetro C_a apresentou uma diferença no resultado que pode ser observada comparando os dois gráficos de Pareto ilustrados na Figura 36. O fator temperatura apresentou em Cy0 efeito significativo (p<0,05). Essa mudança aparentemente está relacionada ao ganho de precisão da técnica, utilizando o método Cy0, que permitiu aumentar a resolução da análise. Portanto, efeitos que antes estavam sendo mascarados pelo erro na quantificação puderam ser observados.

Na análise com o método de Cy0, a temperatura apresentou efeito negativo relevante, portanto quanto menor a temperatura maior o C_a. Essa observação pode ser explicada pelo V_r. Em temperaturas menores, com mesma [Triton X-114], o V_r é maior e, portanto o volume da fase diluída (F_d) é menor, concentrando mais as partículas adenovirais que possuem preferência por essa fase.

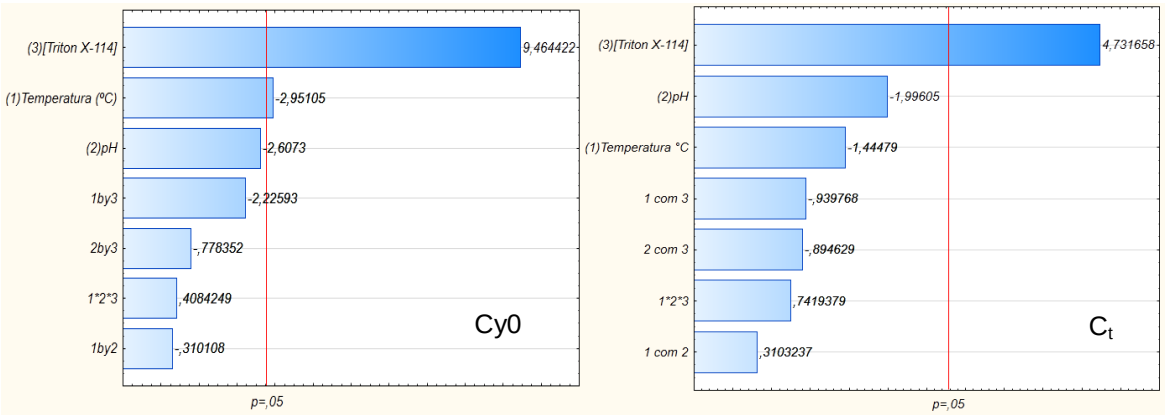

Figura 36: Gráficos de Pareto de efeitos padronizados; Variável: C_a.
Fonte: Autor
Gráfico de Pareto gerado com resultados calculados com Cy0 e C_t.como demarcado na figura.

A análise de variância (ANOVA) (Tabela 23) propiciou outro indicativo que a mudança ocorrida é devida a maior precisão da técnica. Os valores de p estão menores para todos os parâmetros significativos, indicando um aumento na certeza sobre esses efeitos.

Tabela 23: Análise de variância (ANOVA) do C_a calculado com resultados do método Cy0.

Fator	SQ	Grau de Liberdade	Média dos quadrados	F	p
(1) T°C	0,127189	1	0,127189	8,70867	0,0419
(2) pH	0,099284	1	0,099284	6,79799	0,0596
(3) [Triton X-114]	1,308239	1	1,308239	89,57529	0,0007
1 com 2	0,001405	1	0,001405	0,09617	0,7720
1 com 3	0,072364	1	0,072364	4,95478	0,0900
2 com 3	0,008848	1	0,008848	0,60583	0,4798
1*2*3	0,002436	1	0,002436	0,16681	0,7039
Erro	0,058420	4	0,014605		
Total SQ	1,678185	11			

Ajuste R^2 = 0,96
*Valores em vermelho indicam os resultados com significância estatística (p<0,05); SQ: Soma dos quadrados.

5.8.1.2. *Recuperação da potência viral específica - RPvφ (%)*

A recuperação da potência viral específica também apresentou modificações quanto ao número de efeitos significativos (*p*<0,05). Novamente a maior precisão do método Cy0, provavelmente permitiu uma maior resolução na análise permitindo observar os efeitos de menor intensidade.

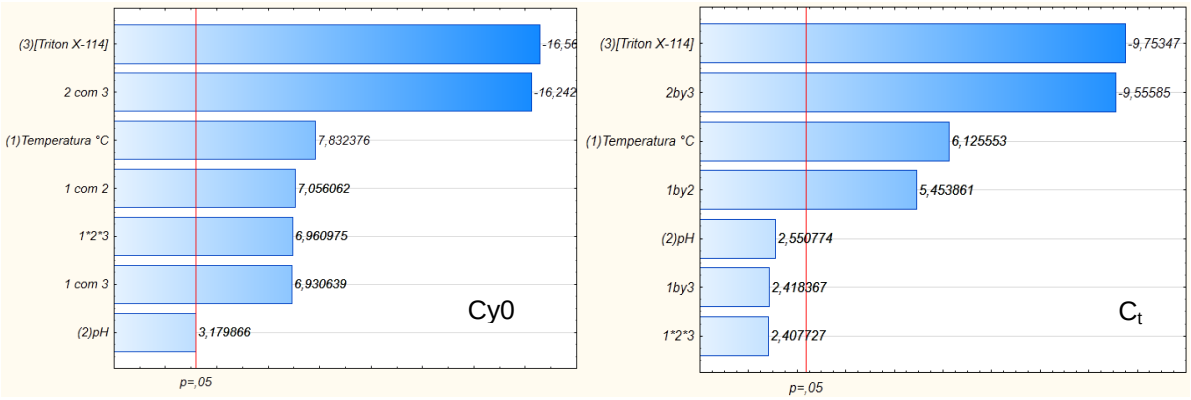

Figura 37: Gráficos de Pareto de efeitos padronizados; Variável $R_{Pv\varphi}$
Fonte: Autor
Gráfico de Pareto gerado com resultados calculados com Cy0 e C_t.como demarcado na figura.

A análise de variância (ANOVA) também apresentou indícios de que houve uma maior precisão (Tabela 24). Os valores de *p* foram menores quando comparados com os encontrados com o método C_t. Esse resultado indica uma maior certeza sobre os efeitos, indicando um menor erro embutido nos resultados, como foi observado com os valores de DPR entre as duas técnicas.

Tabela 24: Análise de variância (ANOVA) da Recuperação da potência específica ($R_{Pv\phi}$), calculada com resultados do método Cy0.

Fatores	SQ	Grau de Liberdade	Média dos quadrados	F	p
(1) T°C	150606	1	150605,6	61,346	0,0043
(2) pH	24824	1	24824,0	10,111	0,0501
(3) [Triton X-114]	673533	1	673533,1	274,350	0,0005
1 com 2	122230	1	122230,3	49,788	0,0059
1 com 3	117924	1	117923,6	48,034	0,0062
2 com 3	647682	1	647682,5	263,8202	0,0005
1*2*3	118958	1	118958,2	48,4552	0,0061
Erro	7365	3	2455,0		
Total SQ	2862340	10			

Ajuste R^2 = 0,997

*Valores em vermelho indicam os resultados com significância estatística (p<0,05); SQ: Soma dos quadrados.

5.8.2. Análise estatística – Planejamento 2, calculado com o método Cy0

Os resultados do Planejamento 2 estão resumidos na Tabela 25. Todos os parâmetros foram avaliados procurando mudanças no resultados da análise utilizando o método Cy0. Em nenhum dos parâmetros houve uma mudança significativa, ou seja, mudança nos tipos de efeitos significativos (p<0,05). A resolução dos experimentos aumentou como pode ser observado nos valores p nos efeitos dos fatores e suas interações.

Tabela 25: Resultados do Planejamento 2, calculados pelo método Cy0.

Ensaio	T (°C)	pH	[T X114] (%m,m)	Vr	Ka	Ga	Ca	Ya Fc (%)	Ya Fd (%)	Bp	Ca
A2	33,0	6,0	1,0	0,54	7,18	9,21	0,70	66,12	75,33	71,68	0,92
B2	37,0	6,0	1,0	72,24	1131,70	0,07	0,79	75,10	75,17	73,99	1,02
C2	33,0	7,0	1,0	51,45	683,58	0,08	0,57	53,37	53,45	75,90	0,70
D2	37,0	7,0	1,0	38,79	607,73	0,10	0,63	60,02	60,11	78,23	0,77
E2	33,0	6,0	11,0	17,51	10,73	6,38	1,60	68,46	74,83	47,17	1,45
F2	37,0	6,0	11,0	105,02	85,92	0,81	1,37	69,26	70,07	45,95	1,51
G2	33,0	7,0	11,0	25,68	17,12	5,29	2,01	90,52	95,80	50,38	1,80
H2	37,0	7,0	11,0	462,88	589,12	0,11	1,01	63,86	63,97	59,05	1,08
I2	35,0	6,5	6,0	337,23	654,62	0,09	0,81	56,97	57,05	61,71	0,92
J2	35,0	6,5	6,0	555,15	1077,65	0,09	1,37	96,06	96,14	67,70	1,42
K2	35,0	6,5	6,0	409,14	794,22	0,09	1,02	71,79	71,88	64,76	1,11
L2	35,0	6,5	6,0	483,45	938,47	0,09	1,25	87,90	88,00	70,00	1,26

T: Temperatura (°C); $V_{r:}$ Razão volumétrica; K_a: Coeficiente de partição; Y_a: Rendimento; $F_{c:}$ Fase rica em micelas; F_d: Fase pobre em micelas; B_p: Balanço de partículas adenovirais; $C_{a:}$ Fator de concentração; Y_p: rendimento de recuperação de proteínas totais; F_p: Fator de purificação

6. CONCLUSÃO

O mercado biofarmacêutico está apenas em seu início, com novos biofármacos sendo desenvolvidos a cada dia. Dentre eles há os adenovírus recombinantes que possuem dois vetores modificados com o gene p53 em fase quatro de estudos clínicos para o tratamento de tumores malignos avançados na tireoide e tumor Oral e Maxillofacial maligno avançado (EDELSTEIN, 2012). Outros vetores e vírus também estão sendo estudados e todos dependerão de um processo eficiente de extração para sua aplicação em escala mundial.

Em um futuro próximo podemos ter esses bioprodutos liberados para o uso humano, o que aumenta a importância de estudos de produção desses vetores, principalmente nas etapas de extração. É imprescindível, tanto para as aplicações de adenovírus como vetor viral para terapia gênica como para vacina gênica, que as partículas virais mantenham sua capacidade de inserção de material genético dentro das células alvo. Dentro dessas especificações o SMDFA pode contribuir com os processos de extração a atingir esse objetivo. Um simples estudo com três fatores demonstrou que o SMDFA possui a capacidade de atingir resultados altamente desejados, como o aumento na relação de partículas infecciosas por partículas virais totais (no presente trabalho é representado por Pvφ). O aumento de 13 vezes obtido em um dos ensaios e a indicação da análise estatística demonstram a possibilidade de aumentar ainda mais esse parâmetro com estudos de otimização dos fatores e de outros fatores tradicionalmente estudados (i.e adição de sais).

Outro parâmetro importante que pode ser explorado ainda mais é o C_a. Como indicado através da análise estatística, valores maiores de C_a podem ser alcançados, mesmo com o uso de menor quantidade de reagentes. O uso de sistemas em condições próximas à curva binodal podem propiciar isso. Os dados apresentados no presente trabalho forneceram base e direcionamento para outros estudos para otimização de extração aplicando SMDFA. De fato, é possível adotar uma estratégia de delineamento experimental sequencial (BOX *et al.*, 2005) aprofundando o conhecimento sobre o efeito dos fatores para encontrar o ponto ótimo de extração.

A informação sobre os contaminantes foi minimamente explorada, uma vez que se trata de um sistema biológico de produção. Outros contaminantes, além de

proteínas, devem estar presentes, como lipídeos (membrana celular) e substâncias como o indicador de pH do meio de cultivo. A remoção de ambos não foi avaliada no presente trabalho, porém foi possível observar uma cor mais intensa nas fases rica em micelas indicando a presença dessa substância. É esperado que lipídeos e proteínas de membrana (alto caráter hidrofóbico) tenham sido extraídos nessa fase.

Os resultados relacionados ao aumento do volume total do sistema não apresentaram diferença em nenhum dos parâmetros avaliados, porém a faixa de estudo foi curta quando comparados com processos industriais onde os processos são em várias ordens maiores que os estudados.

O emprego da metodologia Cy0 para a quantificação do adenovírus utilizando o PCRq permitiu análise do comportamento do adenovírus no sistema com maior precisão. Esse aumento na precisão significou um aumento na resolução do planejamento fatorial, permitindo observar efeitos anteriormente mascarados pelo erro experimental. Essa observação apoia a necessidade do desenvolvimento de um *Software* para o cálculo necessário para essa metodologia, até o presente momento inexistente de forma difundida.

Em conclusão, o SMDFA apresentou indicativos de sua aplicação na extração de partículas adenovirais, com características interessantes, como aumento de Pvφ. Entretanto para aplicação em alta escala de produção, mais estudos devem ser realizados para aperfeiçoar o sistema para extração dessas biopartículas e para testar o comportamento desses sistemas em escalas maiores.

7. REFERÊNCIAS

ALBERTSSON, P. A; CAJARVILLE, A; BROOKS, D. E.; TJERNELD, F. Partition of proteins in aqueous polymer two-phase systems and the effect of molecular weight of the polymer. **Biochimica et biophysica acta**, v. 926, n. 1, p. 87-93, 8 out 1987.

ALLARD, A.; ALBINSSON, B.; WADELL, G. Detection of adenoviruses in stools from healthy persons and patients with diarrhea by two-step polymerase chain reaction. **Journal of Medical Virology**, v. 37, n. 2, p. 149-157, 1992.

BENAVIDES, J.; MENA, J. A; CISNEROS-RUIZ, M. *et al.* Rotavirus-like particles primary recovery from insect cells in aqueous two-phase systems. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 842, n. 1, p. 48-57, set 2006.

BLANKSCHTEIN, DANIEL; THURSTON, G. M.; BENEDEK, G. B. Phenomenological theory of equilibrium thermodynamic properties and phase separation of micellar solutions. **Journal of Chemical Physics**, v. 85, n. 12, p. 7268-7288, 1986.

BOX, G. E. P.; HUNTER, J. S.; HUNTER, W. G. **Statistics for experimenters: design, innovation, and discovery**. [S.l.]: Wiley-Interscience, 2005.

BRAAS, G. M. F.; WALKER, S G; ZHANG, Z.; LYDDIATT, A. NANOPARTICULATE BIOPRODUCTS : RELEVANCE TO THE UP-SCALED MANUFACTURE OF GENE THERAPY VECTORS. v. 78, n. March, 2000.

BRAAS, G. M.; WALKER, S G; LYDDIATT, A. 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**, v. 743, n. 1-2, p. 409-19, 23 jun 2000.

BROWNE, S. M.; AL-RUBEAI, M. Selection Methods for High-Producing Mammalian Cell Lines. In: AL-RUBEAI, MOHAMED (Ed.). **Cell Line Development**. [S.l.]: Springer Netherlands, 2009. v. 6p. 127-151.

DICHTELMÜLLER, H. O.; FLECHSIG, E.; SANANES, F.; KRETSCHMAR, M.; DOUGHERTY, C. J. Effective virus inactivation and removal by steps of Biotest Pharmaceuticals IGIV production process. **Results in Immunology**, v. 2, p. 19-24, jan 2012.

DREYER, S.; KRAGL, U. Ionic liquids for aqueous two-phase extraction and stabilization of enzymes. **Biotechnology and bioengineering**, v. 99, n. 6, p. 1416-24, abr 2008.

DUROCHER, Y.; BUTLER, M. Expression systems for therapeutic glycoprotein production. **Current opinion in biotechnology**, v. 20, n. 6, p. 700-7, dez 2009.

EDELSTEIN, M. **Gene Therapy Clinical Trials Worldwide**. Disponível em: < http://www.abedia.com/wiley/vectors.php>. Acesso em: 28 mar. 2012.

EDELSTEIN, M. **Gene Therapy Clinical Trials Worldwide b**. Disponível em: < http://www.abedia.com/wiley/search_results.php?TrialCountry=&RefResults=&CategoryMain=&Indication=&Vector=Adenovirus&Genes=&GeneTypes=&Phase=Phase+IV&Status=&FinalApprYear=&Submit=%EF%BF%BD%EF%BF%BDSearch%EF%BF%BD%EF%BF%BD>. Acesso em: 28 mar. 2012.

EVERBERG, H.; CLOUGH, J.; HENDERSON, P. *et al.* Isolation of Escherichia coli inner membranes by metal affinity two-phase partitioning. **Journal of chromatography A**, v. 1118, p. 244-252, 2006.

FERNANDES, SHERYL; KIM, H.-S.; HATTI-KAUL, RAJNI. Affinity extraction of dye- and metal ion-binding proteins in polyvinylpyrrolidone-based aqueous two-phase system. **Protein expression and purification**, v. 24, n. 3, p. 460-9, abr 2002.

FERNANDES, S; JOHANSSON, G.; HATTI-KAUL, R. Purification of recombinant cutinase by extraction in an aqueous two-phase system facilitated by a fatty acid substrate. **Biotechnology and bioengineering**, v. 73, n. 6, p. 465-75, jun 2001.

FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields virology**. [S.l.]: Lippincott-Raven, 1996.

FLOTTE, T. R. Gene Therapy : The First Two Decades and the Current State-of-the-Art. **Journal of Cellular Physiology**, n. May, p. 301-305, 2007.

FORCIC, D.; BRGLES, M.; IVANCIC-JELECKI, J. *et al.* Concentration and purification of rubella virus using monolithic chromatographic support. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 879, n. 13-14, p. 981-6, 15 abr 2011.

FORCINITI, D.; HALL, C. K.; KULA, M. R. Protein partitioning at the isoelectric point: influence of polymer molecular weight and concentration and protein size. **Biotechnology and bioengineering**, v. 38, n. 9, p. 986-994, nov 1991.

GARCÍA-PÉREZ, A. I.; SANCHO, P.; PINILLA, M. Surface and metabolic properties of microcytic and macrocytic human anaemic red blood cells detected in polymer aqueous two-phase systems. **Journal of chromatography. B**, v. 711, p. 301-307, 26 jun 1998.
GOTTSCHALK, U. Bioseparation in antibody manufacturing: the good, the bad and the ugly. **Biotechnology progress**, v. 24, n. 3, p. 496-503, 2008.
GREEM, N. M.; WRIGLEY, N. G.; RUSSEL, W. C.; MARTIN, S. R.; MCLACHLANT, A. D. Evidence for a repeating cross-β sheet structure in the adenovirus fibre. **EMBO Journal**, v. 2, n. 8, p. 1357-1365, 1983.
GREEN, D. H.; LEWIS, G. D. Enzymatic amplification of enteric viruses from wastewaters. **Water Science and Technology**, v. 31, n. 5-6, p. 329-336, 1995.
GUESCINI, M.; SISTI, D.; ROCCHI, M. B. L.; STOCCHI, L.; STOCCHI, V. A new real-time PCR method to overcome significant quantitative inaccuracy due to slight amplification inhibition. **BMC bioinformatics**, v. 9, p. 326, jan 2008.
Gene Therapy Clinical Trials Worldwide. Disponível em: <http://www.wiley.com//legacy/wileychi/genmed/clinical/>. Acesso em: 16 mar. 2012.
HAMMAR, L. Concentration of biomaterials: virus concentration and viral protein isolation. In: HARRY WALTER, G. J. (Ed.). **Aqueous Two-Phase Systems**. [S.l.]: Academic Press, 1994. v. 228p. 640-658.
HASMANN, F. A.; CORTEZ, D. V.; GURPILHARES, D. B.; ROBERTO, C.; PESSOA-J, A. Continuous counter-current purification of glucose-6-phosphate dehydrogenase using liquid – liquid extraction by reverse micelles. **Biochemical Engineering Journal**, v. 34, p. 236-241, 2007.
HATTI-KAUL, R. **Aqueous two-phase systems: methods and protocols**. [S.l.]: Humana Press, 2000.
HUSTEDT, H.; KRONER, K. H.; MENGE, U.; KULA, M.-R. Protein recovery using two-phase systems. **Trends in biotechnology**, v. 3, n. 6, p. 139-144, 1985.
JOHANSSON, H.-O.; MATOS, T.; LUZ, J. S. *et al.* Plasmid DNA partitioning and separation using poly(ethylene glycol)/poly(acrylate)/salt aqueous two-phase systems. **Journal of chromatography. A**, v. 1233, p. 30-35, 18 fev 2012.
KAMEI, DANIEL T; LIU, C.-LI; HAASE-PETTINGELL, C. *et al.* Understanding Viral Partitioning in Two-Phase Aqueous Nonionic Micellar Systems : 1 . Role of Attractive Interactions Between Viruses and Micelles. **Biotechnology**, 2002.
KUBO, S.; HAGA, K.; TAMAMOTO, A. *et al.* Adenovirus-retrovirus hybrid vectors achieve highly enhanced tumor transduction and antitumor efficacy in vivo. **Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy**, v. 19, n. 1, p. 76-82, jan 2011.
LANGLAND, J. O.; CAMERON, J. M.; HECK, M. C.; JANCOVICH, J. K.; JACOBS, B. L. Inhibition of PKR by RNA and DNA viruses. **Virus research**, v. 119, p. 100-10, jul 2006.
LEE, C.-K.; SU, W.-D. Nonionic Surfactant-Mediated Affinity Cloud-Point Extraction of Vancomycin. **Separation Science and Technology**, v. 34, n. 16, p. 3267-3277, 1999.
LIU, C. L.; KAMEI, D T; KING, J. A; WANG, D. I.; BLANKSCHTEIN, D. Separation of proteins and viruses using two-phase aqueous micellar systems. **Journal of chromatography B**, v. 711, n. 1-2, p. 127-38, 26 jun 1998.
LIU, C.; DOWNEY, W. **Contract Manufacturing Demand Remains Strong**. Disponível em: <http://www.genengnews.com/gen-articles/contract-manufacturing-demand-remains-strong/3045/>.
LUECHAU, F.; LING, T. C.; LYDDIATT, ANDREW. Interfacial partition of plasmid DNA in aqueous two-phase systems. **Separation and Purification Technology**, v. 67, n. 1, p. 64-70, maio 2009.
LUECHAU, F.; LING, T. C.; LYDDIATT, ANDREW. Recovery of B19 virus-like particles by aqueous two-phase systems. **Food and Bioproducts Processing**, v. 89, n. 4, p. 322-327, out 2011.
MAJHEN, D.; AMBRIOVIĆ-RISTOV, A.; AMBRIOVIC-RISTOV, A. Adenoviral vectors — How to use them in cancer gene therapy ? **Virus Research**, v. 119, n. 2, p. 121-133, ago 2006.
MANIASSO, N. AMBIENTES MICELARES EM QUÍMICA ANALÍTICA. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 87-93, 2001.
MAZZOLA, P. G.; LOPES, A. M.; HASMANN, F. A. *et al.* Liquid–liquid extraction of biomolecules: an overview and update of the main techniques. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 83, n. 2, p. 143-157, fev 2008.
MORRIS, S. **The Case for Outsourcing Biologics Process Development**. Disponível em: <http://www.biopharminternational.com/biopharm/article/articleDetail.jsp?id=568930&pageID=1&sk=&date=>. Acesso em: 15 mar. 2012.
NORRBY, E. C. J.; ALBERTSSON, P. A. Concentration of Poliovirus by an Aqueous polymer Two-phase system. **Nature**, v. 188, p. 1047-1048, 1960.

PHILIPSON, L.; ALBERTSSON, P. Å.; FRICK, G. The purification and concentration of viruses by aqueous polymer phase systems. **Virology**, v. 11, n. 3, p. 553-571, 1960.
PHILIPSON, L.; ALBERTSSON, P.; FRICK, G. The Purification Aqueous and Concentration Polymer Phase of Viruses Systems. **Virology**, v. 11, p. 553-571, 1960.
PLATIS, D.; LABROU, N. E. Development of an aqueous two-phase partitioning system for fractionating therapeutic proteins from tobacco extract. **Journal of chromatography A**, v. 1128, p. 114-124, 2006.
RANGEL-YAGUI, C. O.; LAM, H.; KAMEI, DANIEL T; *et al.* Partitioning in Two-Phase Aqueous Mixed (Nonionic / Cationic) Micellar Systems. **Biotechnology**, 2003.
RIBEIRO, S. C.; MONTEIRO, G. A.; CABRAL, J. M. S.; PRAZERES, D M F. Isolation of Plasmid DNA from Cell Lysates by Aqueous Two-Phase Systems. **Biotechnology and bioengineering**, v. 78, n. 4, 2002.
RICHARDS, F. A flexible growth function for empirical use. **Journal of Experimental Botany**, v. 10, n. 2, p. 290-301, 1959.
RITO-PALOMARES, M.; NEGRETE, A.; MIRANDA, L. *et al.* The potential application of aqueous two-phase systems for in situ recovery of 6-pentyl-ϰ-pyrone produced by Trichoderma harzianum. **Science**, v. 28, p. 625- 631, 2001.
ROOSMALEN, D. VAN; LAZZARA, M. J.; BROEKE, L. J. P. VAN DEN; KEURENTJES, J. T. F.; BLANKSCHTEIN, DANIEL. Protein partitioning driven by excluded-volume interactions in an aqueous nonionic micellar-gel system. **Biotechnology and bioengineering**, v. 87, n. 6, p. 695-703, 20 set 2004.
ROSA, P. A J.; FERREIRA, I. F.; AZEVEDO, A M.; AIRES-BARROS, M. R. Aqueous two-phase systems: A viable platform in the manufacturing of biopharmaceuticals. **Journal of chromatography. A**, v. 1217, n. 16, p. 2296-305, abr 2010.
ROWE, W.; HUEBNER, R.; GILMORE, L.; PARROTT, R.; WARD, T. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. **Proceedings of the society for experimental biology and medicine**, v. 3, p. 570-573, 1953.
SAITOH, T.; HINZE, L. W. USE OF SURFACTANT-MEDIATED PHASE SEPARATION (CLOUD POINT EXTRACTION) WITH AFFINITY LIGANDS FOR THE EXTRACTION OF HYDROPHILIC PROTEINS. **Talanta**, v. 42, n. 1, p. 119-127, 1995.
SCHLOER, G. M.; BREESE, S. S. Purification of african malignant catarrhal fever virus using a two-phase aqueous polymer system. **The Journal of general virology**, v. 59, n. Pt 1, p. 101-10, mar 1982.
SETH, P.; WILLINGHAM, M. C.; PASTAN, I. Binding of adenovirus and its external proteins to Triton X-114. Dependence on pH. **The Journal of biological chemistry**, v. 260, n. 27, p. 14431-144344, 25 nov 1985.
SIVARS, U.; TJERNELD, FOLKE. Mechanisms of phase behaviour and protein partitioning in detergent / polymer aqueous two-phase systems for puri ¢ cation of integral membrane proteins 1. **Science**, v. 1474, p. 133-146, 2000.
STOUTEN, P. F. W.; SANDER, C.; HEIDELBERG, D.-; *et al.* New Triple-helical Model for the Shaft of the Adenovirus Fibre to be understood. **Molecular Biology**, p. 1073-1084, 1992.
TREXLER-SCHMIDT; SZE-KHOOO, S.; COTHRAN, A. R. *et al.* **Purification Strategies to Process 5 g/L Titers of Monoclonal Antibodies**. Disponível em: <http://www.biopharminternational.com/biopharm/Scale+Up+and+Technology+Transfer%E2%80%94 Downstream+Processes+Articles/Purification-Strategies-to-Process-5-gL-Titers-of- /ArticleStandard/Article/detail/585662?contextCategoryId=43051>.
TRINDADE, I. P.; DIOGO, M. M.; PRAZERES, DUARTE M.F; MARCOS, C. Purification of plasmid DNA vectors by aqueous two-phase extraction and hydrophobic interaction chromatography. **Journal of chromatography A**, v. 1082, p. 176-184, 2005.
VENTURA, S. P. M.; BARROS, R. L. F. DE; PINHO BARBOSA, J. M. DE; *et al.* Production and purification of an extracellular lipolytic enzyme using ionic liquid-based aqueous two-phase systems. **Green Chemistry**, v. 14, n. 3, p. 734, 2012.
WAEHLER, R.; RUSSELL, S. J.; CURIEL, D. T. Engineering targeted viral vectors for gene therapy. **Nature reviews. Genetics**, v. 8, n. 8, p. 573-87, ago 2007.
WAGNER, E. K. **Basic virology**. [S.l.]: Blackwell Pub., 2008.
WALKER, SIMON G; LYDDIATT, ANDREW. Processing of nanoparticulate bioproducts: application and optimisation of aqueous two-phase systems. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 74, n. 3, p. 250-255, mar 1999.
WALSH, G. Biopharmaceutical benchmarks 2010. **Nature biotechnology**, v. 28, n. 9, p. 917-24, set 2010.

WALTER, H.; BROOKS, D. E.; FISHER, D. **Partitioning in aqueous two-phase systems: theory, methods, uses, and application to biotechnology**. [S.l.]: Academic Press, 1985.

WANG, F.; PUDDY, A. C.; MATHIS, B. C. *et al.* Using QPCR to assign infectious potencies to adenovirus based vaccines and vectors for gene therapy: toward a universal method for the facile quantitation of virus and vector potency. **Vaccine**, v. 23, n. 36, p. 4500-4508, 22 ago 2005.

WOLD, W. S. M.; TOLLEFSON, A. E. **Adenovirus Methods And Protocols: Adenoviruses, Ad Vectors, Quantitation, And Animal Models**. 2. ed. [S.l.]: Humana Press, 2007. p. 185-192

XIA, D.; HENRY, L. J.; GERARD, R. D.; DEISENHOFER, J. Crystal structure of the receptor-binding domain of adenovirus type 5 fiber protein at 1.7 A resolution. **Stucture**, v. 2, n. 12, p. 1259-1270, 1994.

8. APENDICE

8.1. PROGRAMA PARA CÁLCULO DO CY0

As linhas de comando do programa desenvolvido em plataforma MATLAB, estão descritos abaixo. Esse programa foi desenvolvido seguindo as orientações presentes no artigo de Guescini *et al.* (2008). A programadora Carine de Godoy Rezende Costa escreveu o programa em colaboração com o presente autor.

Os dados de entrada para o programa devem ser organizados previamente, para que ele funcione corretamente. Os dados utilizados são valores de ΔRn, gerados pelo aparelho 7500 *Fast Real-Time PCR System* da Applied Biosystems, e devem estar organizados em uma única coluna, com decimais expressos por ponto e salvos em uma arquivo .ascii (.txt).

O programa irá gerar os resultados de Cy0 e salvar em .txt, assim como irá salvar figuras das tentativas de ajuste, para posterior avaliação em caso de suspeita de falha de cálculo.

```
clear all% limpa tudo o que estava na memoria
close all            % fecha todas as janelas de figuras

for i=8 % controla o numero de reacoes


   %% REORGANIZA AS TABELAS DE ABSORBANCIA DE ACORDO COM OS POCOS E CICLOS

%     load ../testeitalia/absorbanciaitalia.txt          % carrega os dados de absorbancia
   eval(['load ./Absorbancia_' num2str(i) '.txt'])  % carrega os dados de absorbancia da reacao i

   % escreve uma tabela onde as linhas sao os pocos (A1,A2,A3,...,H12) e as colunas os ciclos
(1,2,3,...,40)

   for k=1:40     % para cada poco (linha)...
%              tabela(k,:)=absorbanciaitalia(k:40:96*40);   % ...encontra as absorbancias de cada ciclo
(colunas)
      eval(['tabela(k,:)=Absorbancia_' num2str(i) '(k:40:96*40);']) %  ...encontra as absorbancias de
cada ciclo (colunas)
   end

   %% Método Cy0

   x=1:40; % ciclos

   % ajusta a funcao de Richard para cada poï¿½o

   for p=1:96  % percorre os poços

      cond=0; % condicao igual a 0 deixa rodar
      r=1;    % contador de rodadas

      maximo=max(tabela); %MÁximo de cada reaÇãO
      maximo=maximo(maximo>0.5); %remove valores menores que 0.5 de DeltaRn
      chuteFmax=mean(maximo); %nome da variavel que É a mÉdia do maximos

      chuteb=3;
      chutec=1;
      chuted=1;

      while cond==0 && r<50

         dados=tabela(:,p);  % armazena os dados do poço p na variavel "dados"

         % chuta Fb apenas para primeira rodada
         if r==1
            chuteFb=mean(dados(1:7)); % mï¿½dia dos 7 primeiros dados de fluorescência de cada
reação
         end

         % faz o ajuste da função de Richard aos dados do poço p
         % esse ajuste encontra os 5 parametros da funcao de Richard
         eval(['ff=ezfit(dados,"f(x)=Fb+(Fmax/(1+exp(-(1/b)*(x-c)))^d); Fb=' num2str(chuteFb) '; Fmax='
num2str(chuteFmax) ';c=' num2str(chutec) '; b=' num2str(chuteb) '; d=1");'])

         % salva os 5 parametros
         makevarfit
         Fb
         Fmax
         b
```

```
c
d

% armazena a reta ajustada
f=Fb+(Fmax./(1+exp(-(1/b)*(x-c))).^d);

% encontra o ponto de inflexï¿½o da curva ajustada
Flexx(r,p)=c+(b*log(d));            % coordenada x do ponto de inflexão
Flexy=(Fmax*(d/(d+1))^d+Fb);    % coordenada y do ponto de inflexão

% inclinação da reta que passa pelo ponto de inflexão (coeficiente angular)
m=(Fmax/b)*((d/(d+1))^(d+1));

% calcula o valor de Cy0
Cy0=(c+(b*log(d)))-(b*((d+1)/d)*(1-((Fb/Fmax)*(((d+1)/d)^d))));

coefb=Flexy-(m*Flexx(r,p));  % coeficiente linear
tang=m*x+coefb;         % reta tangente

FB(r,p)=Fb;
FMAX(r,p)=Fmax;
B(r,p)=b;
C(r,p)=c;
D(r,p)=d;
CY0(r,p)=Cy0;
M(r,p)=m;
R2(r,p)=ff.r;

%% plota graficos absorbancia x ciclo para cada poço

figure(1);
plot(dados,'.-k')
hold on
plot(f,'ok')
plot(Flexx(r,p),Flexy,'dk','MarkerFaceColor','k')
plot(Cy0,0,'.k','markersize',20)
plot(tang,'k')
ylim([-1 7])
legend(['dados experimentais'],['dados previstos'],['ponto de '...
   'inflexão'],['Cy0'],['tangente'],'location','northwest')
xlabel('Ciclos')
ylabel('Fluorescência')
eval(['title(''Poço' num2str(p) ' rodada ' num2str(r) ''')'])
hold off

% salva os graficos em figuras png
eval(['print -dpng ./Absorbancia_' num2str(i) '/poco_' num2str(r) '_' num2str(p) '.png'])

clear Fmax Fb b c d

if r~=1 % a partir da segunda rodada, teste a diferenca relativa entre Cy0(n-1) e Cy0(n)

   cond=abs((CY0(r,p)-CY0(r-1,p))/CY0(r-1,p))<0.001;

end

% ajusta os valores de entrada dos parametros com o valor da ultima rodada
chuteb=B(r,p);
chutec=C(r,p);
chuted=D(r,p);
```

```
            chuteFb=FB(r,p);
            chuteFmax=FMAX(r,p);

            if r==1 % pra primeira rodada, ajusta "c" e "b"
                chutec=Flexx(r,p)-B(r,p)*log(D(r,p));
                chuteb=(FMAX(r,p)./M(r,p)).*((D(r,p)./(D(r,p)+1)).^(D(r,p)+1));
            end

            r=r+1;

        end

        Cy0_f(p)=Cy0;

    end

%     save -ascii richardNrodadas.txt Cy0_f
    eval(['save -ascii richardNrodadas_' num2str(i) '.txt Cy0_f']) % SALVA Cy0

end
```