RAFAELA TAIS ZANARDO

PURIFICAÇÃO DO POLISSACARÍDEO CAPSULAR DE
STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE DE SOROTIPO 14

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT
para obtenção do Título de Mestre em
Biotecnologia

São Paulo
2015

RAFAELA TAIS ZANARDO

PURIFICAÇÃO DO POLISSACARÍDEO CAPSULAR DE
STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE DE SOROTIPO 14

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação Interunidades em Biotecnologia
USP/Instituto Butantan/IPT para obtenção do
Título de Mestre em Biotecnologia

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dra. Viviane Maimoni Gonçalves

Versão Original

São Paulo
2015

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Zanardo, Rafaela Tais.

Purificação do polissacarídeo capsular de *Streptococcus pneumoniae* de sorotipo 14 / Rafaela Tais Zanardo. – São Paulo, 2015.

Orientador: Profa. Dra. Viviane Maimoni Gonçalves.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Purificação e caracterização de polissacarídeo capsular bacteriano.

Versão do título para o inglês: Purification of capsular polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* serotype 14.

1. *Streptococcus pneumoniae* 2. Purificação de polissacarídeo 3. Vacinas pneumocócicas 4. Dodecil sulfato de sódio 5. Ácido tricloroacético 6. Cromatografia I. Gonçalves, Profa. Dra. Viviane Maimoni II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB0124/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Rafaela Tais Zanardo.

Título da Dissertação: Purificação do polissacarídeo capsular de *Streptococcus pneumoniae* de sorotipo 14.

Orientador(a): Profa. Dra. Viviane Maimoni Gonçalves.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ Aprovado(a)

☐ Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Presidente: Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Dr. Vital Brasil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brasil
Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505
ceuaib@butantan.gov.br

São Paulo, 9 de outubro de 2013

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Purificação do polissacarídeo capsular de *Streptococcus pneumoniae* sorotipo 14", protocolo nº. I-1132/13, sob a responsabilidade de Viviane Maimoni Gonçalves e Rafaela Tais Zanardo, não envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica.

Dr. Marcelo L. Santoro
Coordenador da CEUAIB

*Aos meus pais e minha irmã, por contribuírem para
que eu alcançasse esse objetivo e por estarem sempre
ao meu lado, vocês são eternos em meu coração!*

*À todos que acreditaram em mim e tinham certeza de
que eu era capaz, até quando eu mesmo duvidei*

AGRADECIMENTOS

Esse trabalho não é resultado de um esforço individual. Ele nasceu a partir de apoio institucional, instrumental, emocional e espiritual que tive durante toda essa trajetória de grande crescimento profissional e pessoal. Dessa forma, é necessário agradecer à todos que estiveram ao meu lado:

Primeiramente, à minha orientadora, Doutora Viviane, pela oportunidade e paciência em ensinar (desde a época do PÁP), pelo apoio e amizade, além da sua dedicação e competência, e também por ser compreensível com a minha necessidade em viajar para o interior sempre que podia e às vezes até quando não podia. Ao Doutor Joaquin, pelas “idéias malucas”, críticas e sugestões que tornaram esse trabalho realidade. Vocês me mostraram que existem pessoas fazendo pesquisa de verdade.

À Dra. Bete e Dra. Mickje do laboratório de Bioprocessos 1; e à Dra. Martha, Dra. Giovana, Miriam e Luciene do Laboratório de Imunobiotecnologia, pela ajuda prestada com os experimentos,

Aos amigos de laboratório: Verônica, por me ensinar a arte de purificar e os segredos de um bom Elisa; Anne e Bruno, pelas conversas e risadas; Doug, por toda a ajuda e ensinamentos, vou sentir saudades até das mensagens maldosas para testar meu coração, você é como um irmão mais velho; Stef Kraschowetz, obrigada pelos dias de descontração e as gargalhadas que até chegávamos a chorar pelos motivos mais banais e que só nós entendíamos, a conclusão desse trabalho e as dificuldades encontradas, sem dúvida, foram mais felizes e amenas ao seu lado, “vltw flws”; Pepe Cintra e sua “boa vontade” e “simpatia” em nos ajudar sempre que era preciso e das inúmeras mensagens “carinhosas”, sentimos sua falta; Paola Piri, pelas conversas e conselhos sobre a vida pessoal, pelos momentos de estresse que dividíamos e a torcida por um futuro diferente; Dedê, pelos momentos alcoólicos, por tentar me mostrar um lado melhor da capital, pelos pastéis e a companhia no Mercado e por aguentar todos os desabafos; Mari, a única que entende o charme de uma boa música sertaneja e pelos conselhos da vida profissional; Fara Cubanita, desculpa pelos apelidos “carinhosos”, imitações e pelas provocações, “eu, Rafaela; você, Fara!!”; Giovana, obrigada pelas aulas de imuno; Thiara, minha companheira de purificação de polissacarídeo e a eterna menina nova; Wallace, com seu jeito inocente e sempre disposto a nos ajudar. Obrigada à todos, do fundo do coração, pelos ótimos momentos, pelos dias de happy hour e inimigo secreto nos finais de ano, pelas discussões no refeitório, pelos deliciosos bolos e cafés da tarde e por me ensinarem sobre assuntos profissionais e pessoais. O aprendizado e crescimento com vocês foram únicos e hoje levo um pouquinho de cada um na minha essência! Aos técnicos: Cláudia, Aninha, Izilda, Pedro, Fátima, Máximo, Sr. Hélio, Sr. Loury, e Carlos E, sempre ajudando no que fosse preciso.

*Aos meus pais, Márcia e Carlos, que dedicaram parte da sua vida à minha educação e mais uma vez proporcionaram essa oportunidade. Obrigada por estarem sempre junto, mesmo quando longe. Pela ajuda, apoio na realização dos sonhos, carinho todos esses anos e grande incentivo para a conclusão desse trabalho. Vocês são os maiores exemplos da minha vida. Essa conquista é **nossa**! À minha irmã, “Ié”, que é o modelo de dedicação que eu tento seguir, pela torcida nesse tempo e por inúmeras vezes escutar os princípios da purificação e analisar os resultados comigo. Sem vocês eu não seria nada, palavras não bastam para mostrar minha gratidão. Espero retribuir tudo isso. E à minha família, tios, avós e primos, que tanto torceram por mim, pelas conversas e apoio durante toda minha vida.*

Ao meu amigo e namorado “Peixe”, pelo companheirismo e amor todos esses anos, por me apoiar do seu jeito e estar presente sempre que possível. Você me deu forças para chegar até aqui, te amo! À grande família Cunha (e queridos agregados!) e família Cavassan pelos ótimos momentos que passamos juntos todos esses anos, e em especial à Marina e Dona Nena, exemplo de paciência e amor.

À todos os amigos de Fernandópolis, em especial às “caipiras” (Amanda, Cá e Lo) e à Bruna, por nunca me deixarem esquecer que eu seria capaz de enfrentar os obstáculos pelos quais passei, obrigada por estarem ao meu lado mesmo distante, por todas as conversas, risadas, por me acalmarem quando tudo parecia perdido e vibrarem a cada conquista. Vocês não fazem ideia como foram essenciais para o meu equilíbrio emocional. Sinto falta e saudades todos os dias!

Aos amigos de Adamantina pelos churrascos, pela troca de experiência, por me esperarem nos feriados, por me fazerem esquecer quanto trabalho ainda tinha para fazer e pela amizade. Vocês fazem diferença na minha vida. E aos amigos de Sorriso-MT, pelos poucos e tão gostosos momentos que passamos juntos até agora!

À Deus, que esteve em minhas preces todos os dias dessa caminhada, me dando força interior para superar as dificuldades.

Ao Instituto Butantan, pelo espaço e infraestrutura. Ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia e à Fábia, que tanto me ajudou com a parte burocrática. À Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de mestrado e FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo apoio financeiro concedido ao projeto.

*À todos que participaram e acompanharam essa história e esses anos na loucura que é a Capital,
minha gratidão e meu muito obrigada!*

“Todo o futuro da nossa espécie, todo o governo das sociedades, toda a prosperidade moral e material das nações dependem da ciência, como a vida do homem depende do ar.”

Rui Barbosa

“Os dias prósperos não vêm ao acaso; são granjeados como as searas, com muita fadiga e com muitos intervalos de desalento.”

Camilo Castelo Branco

RESUMO

ZANARDO, R. T. **Purificação do polissacarídeo capsular de *Streptococcus pneumoniae* de sorotipo 14.** 2015. 96 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Streptococcus pneumoniae (pneumococo) é um importante patógeno humano, responsável por graves infecções das vias respiratórias. O principal fator de virulência desse microrganismo é a cápsula polissacarídica (PS), antígeno das vacinas atuais, que são elaboradas com os PS purificados de cepas de pneumococo prevalentes na população. O objetivo desse trabalho foi desenvolver um processo de purificação do PS do sorotipo 14 (PS14), responsável por 39% das doenças em crianças de 0-6 anos no Brasil. A metodologia de purificação proposta envolveu inicialmente separação celular por microfiltração tangencial. O produto dessa etapa foi purificado por diferentes estratégias que envolveram combinações de etapas de concentração por ultrafiltração tangencial (50 ou 30 kDa), diafiltração contra diferentes soluções e dodecil sulfato de sódio (SDS), precipitação por etanol (20% e 60%), precipitação de impurezas com detergente catiônico brometo de cetiltrimetilamônio (Cetavlon) ou com ácido tricloroacético (TCA) (0,5%, 1%, 5% e 10%), cromatografia de interação hidrofóbica (CIH) e de troca aniônica (CTA). A pureza do PS14 foi avaliada pelo conteúdo de proteínas e ácidos nucleicos remanescentes e o tamanho por cromatografia de exclusão molecular. A precipitação com Cetavlon pouco contribuiu para o aumento da pureza e foi eliminada do processo, assim com a CIH, que apresentou baixa recuperação. O uso de SDS na diafiltração em membrana de 50 kDa, seguido da precipitação com TCA 5% e precipitações alcoólicas foi eficiente para eliminação dos contaminantes com recuperação de 50% do PS14 obtido em cultivos contínuos com meio quimicamente definido (CCQD), porém foi necessário acrescentar uma etapa de CTA para alcançar a pureza quando o PS14 foi produzido em cultivo batelada com meio complexo (CBMC), neste caso a recuperação final foi 58%. Para aumentar a recuperação do processo foi avaliada a diafiltração em membrana de 30 kDa, a partir do material oriundo de CCQD, e a recuperação final do PS14, obtido com a pureza requerida, ficou em 65%. Ainda com intenção de aumentar a recuperação do processo foi avaliado

o uso da membrana 30 kDa na primeira etapa de concentração, porém com material inicial proveniente de CBMC. Nesse caso a pureza requerida também foi alcançada e a recuperação do PS14 ficou em 42%, provavelmente devido ao maior tempo de processo que levou à hidrólise do PS14 e perda no ultrafiltrado. Sendo assim, o processo mais adequado para purificar PS14 com elevada recuperação, além de tamanho e pureza adequados, é composto pelas seguintes etapas: microfiltração tangencial, concentração em membrana de ultrafiltração tangencial de 50 kDa, diafiltração com SDS em membrana de 30 kDa, precipitação com TCA 5%, precipitações alcoólicas de 20% e 60% e CTA.

Palavras-chave: Pneumococo. Polissacarídeo capsular. Purificação. Ácido tricloroacético. SDS. Cromatografia

ABSTRACT

ZANARDO, R. T. **Purification of capsular polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* serotype 14**. 2015. 96 p. Master Thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Streptococcus pneumoniae (pneumococcus) is an important human pathogen responsible for severe respiratory tract infections. The main virulence factor of this microorganism is the capsular polysaccharide (PS), which is the antigen of all current vaccines, which are prepared with purified PS of pneumococcal strains prevalent in the population. The objective of this work was the development of a new purification process for PS of serotype 14 (PS14), responsible for 39% of diseases in children of 0-6 years old in Brazil. After cell separation by tangential microfiltration, the cell-free culture broth containing PS was concentrated by tangential ultrafiltration (30 or 50 kDa) and different strategies were tested. The strategies involved combinations of the steps: diafiltration with different buffers and sodium dodecyl sulfate (SDS), alcoholic precipitation (ethanol 20% and 60%), precipitation of contaminants with cationic detergent cetyltrimethylammonium bromide (Cetavlon) or trichloroacetic acid (0.5%, 1%, 5% and 10%), hydrophobic interaction chromatography (CIH) and anionic exchange chromatography (CTA). The PS14 purity was evaluated by the content of residual proteins and nucleic acids, and the molecular mass by size exclusion chromatography. The Cetavlon precipitation did not contribute to increase the purity and was eliminated from the process, as well as CIH, which showed low yield. The use of SDS in 50 kDa diafiltration membrane, followed by TCA 5% precipitation and ethanol 20% and 60% precipitation was effective for eliminating contaminants with yield of 50%, when PS14 was obtained in continuous cultivation using chemically defined medium (CCQD). However, a CTA step was necessary to accomplish the required purity when the PS was produced in batch culture using complex medium (CBMC). In this case, 58% yield was achieved. In order to increase the process yield, an ultrafiltration membrane of smaller pore, 30 kDa, was applied and the final yield of PS14, increased to 65%, from starting material of CCQD. Also aiming to improve the process recovery, the 30 kDa membrane was applied to the first concentration step, but with starting material from CCQD. In this case, the required purity was achieved and the PS14 recovery was 42%, probably due to the increased

processing time, which resulted in PS14 hydrolysis and loss in ultrafiltrate. In conclusion, the best purification process with high recovery and adequate PS14 size and purity, consisted of the following steps: tangential microfiltration, concentration by tangential ultrafiltration (50 kDa), diafiltration with SDS by ultrafiltration membrane (30 kDa), TCA and ethanol (20% e 60%) precipitations and CTA.

Keywords: Pneumococcus. Capsular polysaccharide. Purification. Trichloroacetic acid. SDS. Chromatography

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da estrutura do pneumococo.	22
Figura 2 - Imagem de microscopia eletrônica da cápsula polissacarídica de pneumococo corada com anticorpo marcado com ferritina.	23
Figura 3 - Taxa de mortalidade pela doença pneumocócica em crianças menores que 5 anos (por 100000 crianças).....	24
Figura 4 - Principais sorotipos associados à resistência à penicilina	26
Figura 5 – Estrutura química das subunidades repetitivas do polissacarídeo capsular de <i>Streptococcus pneumoniae</i> do sorotipo 14.....	29
Figura 6 – Variação da carga da proteína com o pH.	33
Figura 7 - Resumo das características das moléculas apresentadas nesse item	34
Figura 8 - Representação do fluxo convencional (A) e do fluxo tangencial (B) em uma membrana	35
Figura 9 - Esquema do princípio de separação das cromatografias discutidas.	38
Figura 10 - Panorama geral dos processos avaliados para purificação do PS14	37
Figura 11 - Representação esquemática das etapas iniciais do processo de purificação do PS14.	43
Figura 12 - Sistema <i>LabScale</i> usado nas etapas de diafiltração das amostras	45
Figura 13 - Coluna HiTrap Q-Sepharose 1ml (esquerda) e cromatógrafo Äkta Avant 150 utilizado nos processos cromatográficos (direita).	46
Figura 14 - Fluxograma das etapas do processo de purificação 1	51
Figura 15 - Recuperação global do PS14 e pureza relativa em relação aos ácidos nucleicos e proteínas ao longo das etapas do processo de purificação 1.	52
Figura 16 - Distribuição do tamanho do PS14 purificado no processo 1	54
Figura 17 – Fluxograma das etapas do processo de purificação 2	55
Figura 18 – Recuperação global do PS14 e pureza relativa em relação aos ácidos nucleicos e proteínas ao longo das etapas do processo de purificação 2.	56

Figura 19 - Distribuição do tamanho do PS14 purificado no processo 2	57
Figura 20 - Fluxograma das etapas do processo de purificação 3	58
Figura 21 – Recuperação global do PS14 e Pureza Relativa em relação aos ácidos nucleicos e proteínas ao longo das etapas do processo de purificação 4	59
Figura 22 - Distribuição do tamanho do PS14 purificado no processo 3	60
Figura 23 - Fluxograma das etapas do processo de purificação 4 e 5	62
Figura 24 – Comparação da recuperação do PS14 nos processos de purificação 4 e 5	63
Figura 25 - Distribuição do tamanho do PS14 purificado nos processos 4 e 5	64
Figura 26 - Fluxograma das etapas do processo de purificação 6	65
Figura 27 – Recuperação global do PS14 e pureza relativa em relação aos ácidos nucleicos e proteínas ao longo das etapas do processo de purificação 6.	66
Figura 28 - Distribuição do tamanho do PS14 purificado no processo 6	67
Figura 29 - Fluxograma das etapas do processo de purificação 7	69
Figura 30 - Recuperação global do PS14 e Pureza Relativa em relação aos ácidos nucleicos e proteínas ao longo das etapas do processo de purificação 7. Média e desvio padrão de 2 experimentos independentes.	70
Figura 31 - Distribuição do tamanho do PS14 purificado no processo 7	71
Figura 32 - Fluxograma das etapas do processo de purificação 8	73
Figura 33 – Recuperação global do PS14 e Pureza Relativa em relação aos ácidos nucleicos e proteínas ao longo das etapas do processo de purificação 8. Média e desvio padrão de 2 experimentos independentes.	74
Figura 34 - Distribuição do tamanho do PS14 purificado no processo 8	75
Figura 35 - Fluxograma das etapas do processo de purificação 9	77
Figura 36 - Recuperação global do PS14 e Pureza Relativa em relação aos ácidos nucleicos e proteínas ao longo das etapas do processo de purificação 9. Média e desvio padrão de 2 experimentos independentes.	78
Figura 37 - Distribuição do tamanho do PS14 purificado no processo 9	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Cultivos de <i>Streptococcus pneumoniae</i> realizados para a produção e purificação do PS14	40
Tabela 2 - Tabela do processo de purificação 1	53
Tabela 3 - Tabela do processo de purificação 2	57
Tabela 4 - Tabela do processo de purificação 4	60
Tabela 5 - Comparação da pureza relativa em relação aos ácidos nucleicos e proteínas dos processos de purificação 4 e 5.	62
Tabela 6 - Comparação entre o fator de purificação por etapa em relação aos ácidos nucleicos e proteínas dos processos de purificação 4 e 5.....	64
Tabela 7 - Tabela do processo de purificação 6. Média e desvio padrão dos valores obtidos em 2 experimentos independentes.	67
Tabela 8 - Tabela do processo de purificação 7. Média de 2 experimentos independentes.....	71
Tabela 9 - Tabela do processo de purificação 8. Média e desvio padrão de 2 experimentos independentes.	75
Tabela 10 - Tabela do processo de purificação 9. Média e desvio padrão de 2 experimentos independentes.	79
Tabela 11 - Resumo dos resultados finais de todos os processos realizados para purificação do polissacarídeo capsular de <i>S. pneumoniae</i> sorotipo 14....	80
Tabela 12 - Principais características dos processos de purificação analisados	84

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

Abs – absorbância

AN – ácidos nucleicos

A260nm – absorbância a 260nm

BgaA – enzima β -Galactosidase A

BSA – albumina de soro bovino (*bovine serum albumin*)

CA – cromatografia de afinidade

C_{AN} – concentração de ácidos nucleicos

CBMC – cultivo em batelada com meio complexo

CCQD – cultivo contínuo com meio quimicamente definido

Cetavlon – brometo de cetiltrimetilamônio

CIH – cromatografia interação hidrofóbica

CLAE – EM – cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular

cm – centímetro

C_P – concentração de proteína

C_{PS} – concentração de polissacarídeo capsular

CTA – cromatografia troca aniônica

Ø – diâmetro da coluna cromatográfica

DOC – desoxicolato de sódio (*sodium deoxycholate detergente*)

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético (*Ethylenediamine tetraacetic acid*)

ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay*

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

FP_G – Fator de purificação global

FP_E – Fator de purificação por etapa

g – gramas

GSK – GlaxoSmithKline

H – horas

IgG – imunoglobulina G

kDa – quilodaltons

L – litros

Lc – altura do leito cromatográfico

LTA – ácido lipoteicóico

m – massa

M – molar

µg – microgramas

µm – micrômetro

Min – minutos

mL – mililitros

mM – milimolar

Nm – nanômetro

OMS – Organização Mundial da Saúde

P – proteína

PCV7 – vacina pneumocócica 7-valente conjugada

PCV10 – vacina pneumocócica 10-valente conjugada

PCV13 – vacina pneumocócica 13-valente conjugada

pH – potencial hidrogeniônico

pI – ponto isoeletrico

Ppt – precipitado

PR – pureza relativa

PR_{An} – Pureza relativa em relação aos ácidos nucleicos

PR_{Prot} – Pureza relativa em relação às proteínas

PS – polissacarídeo capsular

Psi – libra força por polegada quadrada (*pound force per square inch*)

PspA – proteína A de superfície do pneumococo (*Pneumococcal surface protein A*)

PS14 – polissacarídeo capsular produzido por *S. pneumoniae* sorotipo 14

RcE – recuperação por etapa

RcG – recuperação global

RID – detector de índice de refração

RPM – rotações por minuto

SDS – dodecil sulfato de sódio (*sodium dodecyl sulfate*)

StrH – enzima β-N-Acetilhexosaminidase

TCA – ácido tricloroacético (*trichloroacetic acid*)

TA – ácido teicóico

V – volume

VC – volume da coluna cromatográfica

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	20
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	21
2.2 Epidemiologia.....	24
2.3 Tratamentos e Vacinas.....	26
2.4 Polissacarídeo Capsular do Sorotipo 14 (PS14)	28
2.5 Purificação do Polissacarídeo	29
2.5.1 <i>Contaminantes e principais técnicas de purificação</i>	32
2.5.1.1 <u>Separação celular</u>	34
2.5.1.2 <u>Concentração e Diafiltração</u>	36
2.5.1.3 <u>Precipitação</u>	36
2.5.1.4 <u>Cromatografias</u>	37
3 OBJETIVOS	39
3.1 Geral.....	39
3.2 Específicos	39
4 MATERIAS E MÉTODOS.....	40
4.1 Microrganismo.....	40
4.2 Cultivo e separação inicial.....	40
4.3 Purificação do PS	41
4.3.1 <i>Etapas iniciais: Separação celular e concentração</i>	42
4.3.2 <i>Precipitação alcoólica a 20%</i>	43
4.3.3 <i>Precipitação alcoólica a 60%</i>	43
4.3.4 <i>Solubilização em água</i>	44
4.3.5 <i>Tratamento com detergente catiônico brometo de cetiltrimetilamônio (Cetavlon)</i>	44
4.3.6 <i>Concentração em membrana de 30 kDa ou 50 kDa</i>	44
4.3.7 <i>Tratamento com dodecil sulfato de sódio (SDS) a 0,5%</i>	45
4.3.8 <i>Precipitação de contaminantes com ácido tricloroacético (TCA)</i>	45
4.3.9 <i>Cromatografia de Interação Hidrofóbica (CIH)</i>	46
4.3.10 <i>Cromatografia de Troca Aniônica em Q-Sepharose (CTA)</i>	46
4.3.11 <i>Cromatografia de Adsorção em Batelada</i>	47
4.3.12 <i>Liofilização</i>	47

4.4 Métodos Analíticos	47
4.5 Análise dos Resultados	48
5 RESULTADOS	50
5.1 Processo de Purificação 1	50
5.2 Processo de Purificação 2	55
5.3 Processo de purificação 3	58
5.4 Processo de purificação 4 e 5	61
5.5 Processo de purificação 6	65
5.6 Processo de purificação 7	68
5.7 Processo de purificação 8	72
5.8 Processo de purificação 9	76
6 DISCUSSÃO	80
7 CONCLUSÃO.....	88
REFERÊNCIAS.....	89

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A infecção causada por *Streptococcus pneumoniae* é a maior causa de pneumonia bacteriana, meningite e sepse em crianças menores que 5 anos, podendo levar o paciente ao óbito (NATURE REVIEWS MICROBIOLOGY, 2009; O'BRIEN et al., 2009). A pneumonia pneumocócica é considerada uma das infecções mais prevalentes e sérias acometendo principalmente crianças, idosos e indivíduos com o sistema imune comprometido (VIEIRA et al., 2007).

A cápsula polissacarídica forma a camada mais periférica da célula e é o principal fator de virulência desse microrganismo (WEINBERGER et al., 2009). Sua estrutura é bastante variável, o que permite subdividir essa bactéria em mais de 90 sorotipos diferentes conhecidos. No Brasil, o sorotipo 14 é o isolado mais comumente encontrado em doenças invasivas (ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD - OPAS, 2011).

A vacinação é a forma mais eficaz de prevenção contra as infecções pneumocócicas. Todas as vacinas utilizadas atualmente para combater essa doença têm como base o polissacarídeo (PS) capsular, livre ou conjugado a uma proteína carregadora. Infelizmente, devido ao preço elevado, muitas vezes essas vacinas não estão disponíveis para as parcelas mais carentes da população e as licenciadas no Brasil não são capazes de cobrir todos os casos de doenças pneumocócicas. Uma solução para aumentar a cobertura e reduzir os gastos excessivos em prevenção ao pneumococo seria a produção de uma nova vacina conjugada nacional. Tal vacina, como vem sendo desenvolvida pelo Instituto Butantan, conteria os polissacarídeos dos sorotipos prevalentes no Brasil conjugados a uma proteína carregadora do próprio *S. pneumoniae*, dessa forma poderia incluir menor número de PS, pois as proteínas carregadoras ofereceriam uma proteção independente do sorotipo, o que seria uma vantagem sobre as vacinas conjugadas atualmente no mercado.

Desta forma, a viabilidade da produção desta nova vacina conjugada, entre outras coisas, exige um processo de purificação do PS14 que seja eficiente e reprodutível, como proposto no projeto temático (FAPESP nº 2008/05207-4), ao qual este trabalho está relacionado.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae, ou pneumococo, foi uma das primeiras bactérias caracterizadas e amplamente estudada desde seu primeiro isolamento em 1881 por George M. Sternberg nos Estados Unidos e por Louis Pasteur na França, que de forma independente, isolaram esse microrganismo em ratos inoculados com saliva humana. Mais tarde, o pneumococo foi identificado como a maior causa de pneumonia humana e logo depois relacionado com outras patologias como meningite, bacteremia e sinusite (WATSON et al., 2010).

S. pneumoniae é classificada no gênero *Streptococcus*, pertencente à família *Streptococcaceae* (SCHLEIFER et al., 1985). É uma bactéria Gram-positiva, capsulada, com morfologia de diplococos lanceolados e dimensões que variam entre 0,5 e 1,25 μm , de metabolismo anaeróbio aerotolerante e nutricionalmente fastidiosa, pertencente ao grupo das bactérias láticas (ALONSODEVELASCO et al., 1995). É um patógeno exclusivamente humano, encontrado normalmente na microbiota da nasofaringe e orofaringe de indivíduos sadios, principais sítios da colonização dessas bactérias (FERREIRA et al., 2001). A partir da colonização geralmente assintomática, os pneumococos podem invadir outros locais e ser responsáveis por infecções moderadas (otite, sinusite, bronquite e pneumonia) ou graves (pneumonia necrotizante, meningite, bacteremia e sepse), levando muitas vezes os pacientes ao óbito (BRICKS; BEREZIN, 2006). A transmissão direta ocorre por aerossol e a maior incidência da doença grave é entre crianças menores de 5 anos de idade, idosos e indivíduos imunocomprometidos (KAMERLING, 2000).

A estrutura do pneumococo é dividida em três camadas principais (Figura 1): a membrana plasmática, composta de fosfolipídios, glicolipídios e proteínas; a parede celular, que é composta por peptidoglicana, ácido lipoteicóico (LTA) e ácido teicóico (TA), sendo que LTA e TA contêm resíduos de colina que ancoram as proteínas de superfície ligantes de colina e são os principais responsáveis pela resposta inflamatória intensa do pneumococo; e a cápsula polissacarídica (BERGMANN; HAMMERSCHMIDT, 2006).

Muitas questões sobre a virulência de *S. pneumoniae* ainda não foram elucidadas, entretanto sua patogenicidade é atribuída a vários fatores como enzimas autolíticas, polissacarídeo da parede celular, proteínas de superfície, capsula polissacarídica, entre outros, sendo esta última a de maior importância (GARCÍA et al., 2000).

Figura 1 - Representação esquemática da estrutura do pneumococo.

Fonte: Adaptado de MCCULLERS; TUOMANEN, 2001

A cápsula polissacarídica, antígeno empregado na composição de vacinas e estrutura externa do pneumococo (Figura 2), é um polímero de alta massa molecular composto de subunidades repetitivas de oligossacarídeos, cada uma composta de duas a oito moléculas de açúcar, unidos por ligações glicosídicas (KOLKMAN et al., 1997).

A produção da cápsula é indispensável para a virulência deste microrganismo, já que contribui para a progressão da infecção, protegendo-o contra a fagocitose pelo sistema imune do hospedeiro (HANAGE et al., 2007), ao passo que cepas sem cápsula não demonstram colonização estável (NELSON et al., 2007). Outra propriedade da cápsula está na resistência a antibióticos e também no estímulo da produção de anticorpos específicos que podem ser utilizados para classificar o pneumococo em sorotipos. Cada

sorotipo é subdividido com base nas diferenças químicas e antigênicas do polissacarídeo (PS) da cápsula (MUÑOZ-ALMAGRO; SELVA; PALLARES, 2010) e cada um deles inibe a fagocitose com maior ou menor intensidade, o que resulta em uma habilidade diferenciada de cada sorotipo em causar a doença pneumocócica (HENRICHSEN, 1995).

A colonização por um determinado sorotipo não é capaz de induzir resposta imunológica suficiente para evitar a recolonização. Apesar de diversos sorotipos diferentes coexistirem na nasofaringe, a colonização nem sempre tem associação direta com a doença invasiva, ainda assim, fornece a base para a transmissão horizontal do pneumococo (BOGAERT; DE GROOT; HERMANS, 2004).

Dentre os mais de 90 sorotipos conhecidos do microrganismo, 23 deles são responsáveis por aproximadamente 90% das doenças invasivas (JUNG et al., 2011). O sorotipo 14 faz parte dos que são prevalentes no mundo e o mais associado à resistência aos antibióticos (BRICKS; BEREZIN, 2006).

Figura 2 - Imagem de microscopia eletrônica da cápsula polissacarídica de pneumococo corada com anticorpo marcado com ferritina.

As flechas indicam a cápsula polissacarídica. Imagem: ALONSODEVELASCO et al., 1995.

2.2 Epidemiologia

S. pneumoniae é um organismo de importância clínica inquestionável, sendo uma das maiores causas de mortalidade e morbidade mundiais (Figura 3) (O'BRIEN et al., 2009). Em 2008, a Organização Mundial da Saúde estimou que, dentre cerca de 8,8 milhões das mortes anuais entre crianças menores de 5 anos, 476.000 foram em decorrência da doença pneumocócica, sendo que a maioria delas vivem nas regiões mais pobres do mundo e têm pouco acesso a tratamentos médico-hospitalares. Nos países em desenvolvimento as taxas de letalidade entre as crianças mais jovens podem chegar a 20% para sepse pneumocócica (WHO, 2012). Já nos países mais desenvolvidos, o tratamento adequado com antibióticos não tem sido capaz de diminuir a letalidade das doenças pneumocócicas, além disso, o aparecimento de cepas multirresistentes à penicilina e a outros antimicrobianos tem aumentado de forma gradual em várias regiões nas últimas décadas (REINERT, 2009).

No Brasil, no período de 2004 a 2006, a doença pneumocócica foi responsável por 34.217 hospitalizações no Sistema Único de Saúde (SUS), sendo 64,8% destas internações por pneumonia (NOVAES; SARTORI; SOÁREZ, 2011).

Figura 3 - Taxa de mortalidade pela doença pneumocócica em crianças menores que 5 anos (por 100000 crianças)

Fonte: O'BRIEN et al., 2009

A epidemiologia e a distribuição dos sorotipos da doença pneumocócica variam de região para região, ao longo do tempo e de acordo com a faixa etária da população, além das rápidas modificações nos padrões de resistência bacteriana aos antibióticos. Esses fatores determinam a necessidade de avaliações locais periódicas e o monitoramento frequente da resistência antimicrobiana para o estabelecimento de estratégias de controle (OSELKA, 2003). Por exemplo, os sorotipos 1 e 5, raramente encontrados nos Estados Unidos e Canadá, são causa frequente de doença invasiva em países africanos, Israel e Índia.

No Brasil, o sorotipo 14 é responsável por 39% da doença pneumocócica na faixa etária de 0-6 anos e por 10,8% dos casos da doença em crianças de 6-14 anos (ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD - OPAS, 2011). Em 2003, Mantese e colaboradores publicaram um estudo da cidade de São Paulo indicando o sorotipo 14 como o mais frequente isolado clínico em doenças invasivas, e relacionado à resistência à penicilina (MANTESE et al., 2003). Em 2007, os mesmos resultados foram descritos por Vieira e colaboradores, no Distrito Federal (VIEIRA et al., 2007), e em 2011 por Yoshioka e colaboradores, também em São Paulo, os quais relataram este sorotipo como o mais frequente em crianças menores que 21 meses (YOSHIOKA et al., 2011).

O uso indiscriminado de antibióticos tem levado ao aparecimento de inúmeras cepas resistentes aos agentes antimicrobianos, o que diminui as possibilidades de tratamento. Os sorotipos 6A, 6B, 9V, 14, 19A e 23F, estão mais frequentemente associados à resistência antimicrobiana devido a sua facilidade em adquirir os genes de resistência e incorporá-los em seu cromossomo pelo processo de transformação genética (BRANDILEONE et al., 2006). No Brasil, Brandileone e colaboradores (BRANDILEONE et al., 2006) descreveram que durante o período de 1995 a 2004 o sorotipo 14 apresentou um aumento progressivo da resistência à penicilina (Figura 4). Os mesmos resultados foram encontrados por Yoshioka e colaboradores entre os períodos de 2003 a 2008 (YOSHIOKA et al., 2011).

Figura 4 - Principais sorotipos associados à resistência à penicilina

Fonte: Adaptado de BRANDILEONE et al., 2006

As doenças pneumocócicas invasivas são de difícil tratamento e envolvem o uso de antibióticos caros, longos tempos de hospitalização, além da ampla disseminação por contato direto e em muitos casos resultam em sequelas para o paciente. Sendo assim, a imunização ativa é a estratégia mais indicada para prevenção e diminuição das taxas de mortalidade, desde que agregue os sorotipos prevalentes em cada região geográfica.

2.3 Tratamentos e Vacinas

Existem dois tipos de vacinas disponíveis atualmente: as compostas por polissacarídeos livres e as conjugadas com proteínas carregadoras. O Ministério da Saúde no Brasil disponibiliza gratuitamente as vacinas 23-valente, para a população adulta, e 10-valente conjugada, que é efetiva em crianças menores de dois anos. A vacina 13-valente conjugada, também efetiva em crianças menores de dois anos, está disponível apenas em clínicas particulares.

A vacina 23-valente inclui como antígenos apenas os polissacarídeos capsulares purificados dos sorotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F e 33F. Estes sorotipos foram escolhidos com base na prevalência na Europa e Estados Unidos, apresentando uma cobertura de aproximadamente 90% dos sorotipos causadores da doença pneumocócica nessas regiões (KADIOGLU, et al., 2008), e pouco mais de 80% no Brasil (BUTLER, et al., 1993). Essa vacina é

eficaz em indivíduos adultos jovens e imunologicamente competentes, entretanto, o PS é um antígeno timo-independente e por isso essa vacina não ativa as células de memória e produz baixa resposta imune em crianças e idosos, principalmente nos extremos das idades, que são os principais grupos de risco.

Uma forma de alterar a resposta imune da vacina é conjugar o PS a uma proteína carregadora, que é um antígeno T-dependente, desse modo a imunogenicidade do PS é ampliada pela ligação covalente com a molécula proteica, que faz com que a resposta imune ao PS passe a ser também T-dependente e assim a vacina passa a ser efetiva em crianças. Além disso, vacinas pneumocócicas conjugadas conferem proteção contra a colonização da nasofaringe para os sorotipos nela representados, o que diminui a quantidade de portadores assintomáticos dentro de uma comunidade (SAGE, 2006). Entretanto o custo das vacinas conjugadas é alto, o que impossibilita o uso extensivo para as populações carentes e mais afetadas pelas doenças pneumocócicas em países em desenvolvimento (KADIOGLU et al., 2008).

Em 2009, após um acordo de transferência de tecnologia entre a FIOCRUZ (Fundação Oswaldo Cruz) e o laboratório inglês GlaxoSmithKline (GSK), começou a distribuição da vacina 10-valente conjugada, que é composta pelos PS dos sorotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14 e 23F conjugados independentemente à proteína D de *H. influenzae*, sorotipo 18C conjugado ao toxoide tetânico e o sorotipo 19F ao toxoide diftérico. Essa vacina aumentou a cobertura de sorotipos em países subdesenvolvidos em relação à primeira vacina conjugada comercializada 7-valente, englobando a África, a Ásia e a América Latina, porém ainda apresenta cobertura limitada de sorotipos. No Brasil, por exemplo, essa vacina apresenta cobertura estimada em apenas 60% dos casos das doenças pneumocócicas invasivas (FRANCO et al., 2010), o que poderia levar no futuro ao aumento nos casos de infecções causadas por sorotipos não presentes na vacina, verificando-se assim, a substituição dos sorotipos prevalentes na população devido à pressão seletiva promovida pela vacina, tal como ocorreu nos países que introduziram a vacina conjugada 7-valente há mais tempo (SINGLETON et al., 2007).

A vacina 13-valente conjugada é composta pelos PS dos sorotipos presentes na vacina 10-valente juntamente com os PS dos sorotipos 3, 6A,

19A, todos conjugados independentemente com o toxoide diftérico. A cobertura dessa vacina aumenta para 72% dos sorotipos causadores das doenças pneumocócicas no Brasil (FRANCO et al., 2010), entretanto apresenta as mesmas desvantagens da vacina 10-valente.

Nos últimos anos, diversos estudos têm abordado a formulação de vacinas pneumocócicas proteicas. A utilização de proteínas purificadas como antígenos tem como vantagem em relação às vacinas pneumocócicas tradicionais a segurança de uso bem como o custo de produção, permitindo a sua utilização em países em desenvolvimento, entretanto, na maioria dos casos possuem baixa capacidade em produzir resposta imune e requerem adição de adjuvantes em sua composição (REED et al., 2009).

Uma proposta para aumentar a abrangência das vacinas contra pneumococo é identificar um antígeno comum a todos os sorotipos. A proteína A de superfície do pneumococo (PspA) é uma candidata promissora para a vacina (FIGUEIREDO et al., 2015; KRASCHOWETZ et al., 2015), já que é um antígeno conservado entre diferentes cepas de pneumococo, e cuja proteção contra a doença já foi verificada em modelos animais (FERREIRA et al., 2009; MORENO et al., 2010). Esta proteína também poderia ser usada como carregadora e assim permitir a produção de uma vacina conjugada nacional que aumente a cobertura para as doenças pneumocócicas invasivas e seja mais barata do que as atuais, o que poderia ampliar o acesso da população à vacinação e diminuir o risco de substituição dos sorotipos prevalentes. Para isso, seria necessário o desenvolvimento dos processos de produção dos antígenos da nova vacina visando baixo custo e alto rendimento dos PS capsulares dos sorotipos prevalentes no Brasil e da proteína carregadora.

2.4 Polissacarídeo Capsular do Sorotipo 14 (PS14)

Como já dito anteriormente, o sorotipo 14 é um dos mais frequentes isolados clínicos de pneumococo em todo o mundo e expressa resistência a uma variedade de agentes antimicrobianos, incluindo penicilina e eritromicina. Dessa forma o PS14 está incluso em todas as vacinas pneumocócicas existentes devido à sua importância mundial e é o objeto de estudo desse trabalho.

A estrutura química do polissacarídeo capsular de *S. pneumoniae* sorotipo 14 consiste de unidades repetitivas de: $\rightarrow 6)$ - β -D-N-acetilglucosamina-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-Galactose-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-Glicose-(1 $\rightarrow$, com uma cadeia lateral de β -D-Galactose-(1 $\rightarrow$ ligada ao C4 de cada resíduo de N-acetilglucosamina (Figura 5).

O PS14 é hidrofílico e um dos poucos polissacarídeos neutros de pneumococo, o que o torna de difícil detecção quando comparado aos carregados.

Polissacarídeos capsulares são polidispersos, isto é, podem ter tamanhos variados conforme maior ou menor número de subunidades repetitivas incorporadas na molécula. A média da distribuição da massa molecular para preparação de vacinas varia de acordo com cada polissacarídeo. O valor mínimo requerido para o PS14 é de 450 kDa (YOTHER; BENTHLEY; HENNESSEY JR., 2008)

Figura 5 – Estrutura química das subunidades repetitivas do polissacarídeo capsular de *Streptococcus pneumoniae* do sorotipo 14

Fonte: DENG et al., 2014. Em azul: N-acetilglucosamina; em rosa: glicose; em verde: galactose

2.5 Purificação do Polissacarídeo

Após o término do processo de fermentação, a purificação ou *downstream processing* tem início. As etapas que compõem o processo de purificação são responsáveis por permitir a obtenção do produto de interesse no grau de pureza requerido para o uso pelos órgãos regulatórios, buscando sempre maximizar a recuperação e diminuir o custo.

O processo de *downstream* de polissacarídeos capsulares bacterianos pode ser dividido em duas partes: a separação de células e debris celulares do caldo fermentado inativado e o isolamento e purificação do PS propriamente dito.

A purificação envolve uma série de passos independentes, os quais se utilizam das diferenças entre as propriedades físico-químicas do produto de interesse e dos contaminantes, como solubilidade, hidrofobicidade, carga elétrica, tamanho molecular, termo-resistência e afinidade por outras moléculas, além da localização celular (intra ou extracelular), para que, de forma progressiva, ocorra o enriquecimento da molécula de interesse e a eliminação dos componentes indesejados (SOFER; HAGEL, 1997; WARD, 1991).

O desenvolvimento de técnicas e métodos para a separação e purificação de macromoléculas biológicas tem sido amplamente estudado nas últimas décadas. Melhorias nas técnicas cromatográficas, *software* e análises mais rápidas, além da utilização de sistemas especialistas, têm feito essa separação mais previsível e controlável, sobretudo para proteínas. Entretanto ainda permanecem dificuldades em encontrar condições ótimas de extração e tratamento da amostra, assim como na escolha de métodos adequados para determinar a concentração e monitorar a atividade biológica, o que dificulta o planejamento experimental e torna o processo muitas vezes empírico (JANSON; RYDÉN, 1998). As dificuldades se acentuam no caso de outras macromoléculas que são menos estudadas, como os polissacarídeos.

Os processos clássicos de purificação de PS capsulares bacterianos utilizados como vacinas são compostos por uma série de precipitações seletivas com etanol e/ou detergente catiônico, seguida de centrifugações e ultracentrifugações contínuas e desproteínização com fenol (FRASCH, 1990). Nos processos de purificação desenvolvidos no Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan para os polissacarídeos capsulares de *Neisseria meningitidis* (TANIZAKI et al., 1996), de *Streptococcus pneumoniae* (GONÇALVES et al., 2003, 2007) e de *Haemophilus influenzae* tipo b (TAKAGI et al., 2008), o número de etapas de precipitação com etanol e centrifugação foi reduzido e o uso do fenol foi eliminado completamente, sendo substituído por tratamento com enzimas nucleolíticas e proteolíticas, seguido de ultrafiltração tangencial,

onde o material hidrolisado de baixa massa molecular é removido enquanto o PS fica retido no concentrado. A filtração tangencial nesses processos substituiu a ultracentrifugação, com a vantagem de ser mais barata.

Entre as distintas publicações que abordam os métodos de purificação para obtenção de PS provenientes de *S. pneumoniae*, está o protocolo de Yavordios e Cousin (1983), que consta de inativação do caldo fermentado por fenol, precipitações alcoólicas, tratamento enzimático e tratamento com detergente catiônico brometo de cetiltrimetilamônio seguido de diafiltração. Cano, Kuo e Query (1980) descrevem a lise das células com deoxicolato de sódio (DOC), duas precipitações alcoólicas, que removem grande quantidade de proteínas e outros contaminantes, seguidas de tratamento com brometo de cetiltrimetilamônio, outras três precipitações alcoólicas, tratamento com carvão ativado, além de filtração e diafiltração. Entretanto, dada a variação estrutural de cada PS, esses dois processos precisam ser adaptados de acordo com as propriedades físico-químicas de cada PS.

Estudos recentes descrevem a purificação do PS do sorotipo 19A (PS19A) com as seguintes etapas: lise das células com DOC e fervura, diminuição do pH, precipitações alcoólicas e diálise (JUNG et al., 2011) e dos polissacarídeos 3, 6B, 14, 19F e 23F substituindo as precipitações por fenol e hidrólise enzimática por adsorção de fosfato de alumínio e ultrafiltração (MACHA; LAVANYA; NANNA, 2014). Yuan e colaboradores (2014) purificaram os sorotipos 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F e 23F através da lise das células com DOC, centrifugação, ultrafiltração/diafiltração, diminuição do pH e filtração do precipitado usando carvão ativado, além de outra filtração/diafiltração.

Para o PS do sorotipo 14, o método publicado pelo Instituto Merieux (1980) baseia-se na lise das células com DOC, concentração e diafiltração desse lisado com solução de salina em membrana de ultrafiltração. A solução concentrada é precipitada com 15-35% de etanol, ultracentrifugada e o sobrenadante é precipitado com 50-70% de etanol, recuperando-se o precipitado com o PS após a centrifugação. A etapa seguinte representa a desproteinização por fenol e eliminação de ácidos nucleicos através do tratamento com carvão ativado seguido de diálise e outra precipitação alcoólica

a 60%. O polissacarídeo precipitado é suspenso em etanol absoluto e submetido a lavagens com éter etílico e acetona.

Outro método de purificação do PS14, descrito por Suárez e colaboradores (2001), elimina a utilização de solventes orgânicos por ser baseado em cromatografia de afinidade. Após a lise celular com detergente DOC e centrifugação, o sobrenadante é concentrado por ultrafiltração, dialisado e liofilizado. A amostra liofilizada é suspensa em tampão de fosfato de sódio e centrifugada. O sobrenadante é aplicado em coluna de lectina de soja, que tem afinidade por grupos D-galactose e N-acetil-D-glucosamina, por isso reconhece os resíduos desses açúcares presentes no PS14, e a fração de eluição é dialisada com água destilada e por fim liofilizada.

Uma vez que as etapas de purificação de um produto biotecnológico são responsáveis por 50% a 80% do custo total do processo (LOWE; LOWE; GUPTA, 2001), o desenvolvimento de novas estratégias de purificação é importante para reduzir o custo de produção e viabilizar a obtenção de uma vacina para distribuição gratuita à população.

2.5.1 Contaminantes e principais técnicas de purificação

Dentre os contaminantes que devem ser eliminados durante a purificação de polissacarídeos, destacam-se as proteínas e os ácidos nucleicos. As proteínas apresentam carga elétrica variável de acordo com o seu ponto isoelétrico (Figura 6), regiões hidrofóbicas e hidrofílicas e regiões resistentes ao cisalhamento. São longos polímeros formados por 20 diferentes aminoácidos, cuja sequência e composição determinam sua estrutura e propriedades. Apresentam massa molecular que varia de centenas a milhões de Daltons. Distinguem-se quatro níveis de organizações existentes nas proteínas: estrutura primária, secundária, terciária e quaternária (MOTTA, 2011).

Figura 6 – Variação da carga da proteína com o pH.

Em pH abaixo do ponto isoelétrico as proteínas aparecem carregadas positivamente e acima do ponto isoelétrico aparecem carregadas negativamente.

Os ácidos nucleicos apresentam carga negativa devido ao grupo fosfato presente na molécula, regiões hidrofóbicas e são sensíveis ao cisalhamento. São macromoléculas de massa molecular definida, formados por nucleotídeos. Esses nucleotídeos são compostos por uma base nitrogenada, um grupo fosfato, e resíduos de açúcar que podem ser ribose (RNA) ou desoxirribose (DNA). A estrutura natural dos ácidos nucleicos é composta por centenas ou milhares de nucleotídeos que se encadeiam originando um longo filamento simples (“harpin” – RNA) ou dupla-hélice (DNA). Apresentam apenas 4 unidades repetitivas de bases nitrogenadas: adenina, timina (que é substituída por uracila no RNA), citosina e guanina (NUSSBAUM; MCINNES; WILLARD, 2008) (Figura 7).

Os polissacarídeos são macromoléculas hidrofílicas formadas por longas cadeiras de unidades de monossacarídeos. Sua estrutura pode ser linear (amilose) ou ramificada (glicogênio), contendo uma quantidade variável de resíduos de açúcar (MOTTA, 2011).

Figura 7 - Resumo das características das moléculas apresentadas nesse item

	Características				
	Unidades Repetitivas	Estrutura	Tamanho	Carga	Hidrofobicidade
PS	Oligossacarídeos 2-8 monômeros de açúcar - “monótonos”	Linear/ Ramificados	Elevada massa molar polidispersa	A maioria é (-)	Hidrofílico
Proteína	20 aminoácidos diferentes	Enovelamento	Massa molar bem definida	Depende do pI	Hidrofóbica/ Hidrofílica
AN	A T (U) C G	DNA – dupla hélice RNA – harpim	Massa molar bem definida	(-)	Hidrofóbico

A partir das diferenças entre as propriedades específicas dos contaminantes e as do produto de interesse foram propostos esquemas dos processos de purificação desenvolvidos durante esse trabalho.

A seguir estão descritas as principais operações de purificação utilizadas nesse trabalho para separar PS14 dos contaminantes.

2.5.1.1 Separação celular

O processo de separação de células pode ser realizado por centrifugação, filtração ou sedimentação.

As centrífugas são mais comumente usadas para pequenos volumes, acelerando o processo de sedimentação através de um campo gravitacional centrífugo, sendo usada desde as fases iniciais da purificação (PESSOA-JR; KILIKIAN, 2005)

A filtração caracteriza-se pela separação de amostras em duas fases a partir da diferença de tamanho, podendo restringir total ou parcialmente o transporte de uma ou várias espécies presentes. Essa separação acontece por meio de uma barreira sólida denominada membrana (MULDER, 1996). Esse processo apresenta como vantagem o baixo custo operacional e a aplicação em larga escala, oferecendo grande flexibilidade de uso.

A filtração pode ser convencional (*dead-end*) ou tangencial (*cross-flow*), diferindo entre si pela direção do fluxo em relação à membrana (Figura 8). Na filtração convencional, o sentido do fluxo é perpendicular à superfície da membrana; a solução ou suspensão é pressionada contra a membrana fazendo com que os solutos se depositem sobre a sua superfície, que vai se compactando, aumentando a resistência e diminuindo o fluxo de filtrado.

A filtração tangencial é mais efetiva, já que o fluxo do sistema é paralelo à superfície da membrana. Nessa filtração são formadas duas correntes: do concentrado e do permeado, dificultando assim a sedimentação de partículas na superfície do filtro, as quais são constantemente removidas. O concentrado é rico em moléculas maiores que o poro da membrana e o permeado de materiais com tamanho inferior (MULDER, 1996). Esse concentrado normalmente é recirculado com o objetivo de extrair maior quantidade do microfiltrado ou concentrar determinado componente do retentado. Dessa forma, é possível trabalhar com maior volume de matéria-prima e operar em sistemas contínuos (DZIEAK J., 1990)

Figura 8 - Representação do fluxo convencional (A) e do fluxo tangencial (B) em uma membrana

Fonte: Disponível em: <http://winebusiness.com>

2.5.1.2 Concentração e Diafiltração

As membranas de ultrafiltração são utilizadas na indústria e facilitam a remoção de água e/ou solventes nas etapas de concentração e troca de tampões, constituindo de uma etapa de purificação que elimina contaminantes com tamanhos inferiores ao poro da membrana (oligossacarídeos, peptídeos e oligonucleotídeos), que tem o diâmetro variando entre 1 a 500 nm (WARD, 1991).

Existe uma ampla variedade de polímeros que são usados na fabricação dessas membranas, por exemplo: polietersulfona, celulose regenerada, etc. A escolha da membrana dependerá de parâmetros como hidrofobicidade, compatibilidade química, biológica, térmica, tamanho dos poros e custo (WARD, 1991).

A ultrafiltração com o fluxo tangencial tem como vantagem a filtração relativamente rápida, já que os compostos não se depositam na superfície da membrana devido ao fluxo cruzado e por isso, não obstruem os poros (SHKINEV et al., 1996). Outra vantagem dos sistemas de ultrafiltração tangencial é que além de serem econômicos, quando comparados com as ultracentrífugas, são flexíveis e permitem o trabalho em uma faixa ampla de volume. O aumento de escala pode ser facilmente obtido aumentando o número de filtros, o que viabiliza seu uso na indústria.

2.5.1.3 Precipitação

A precipitação é amplamente utilizada nos processos de purificação e consiste na mudança da solubilidade de um ou mais componentes da solução. As variáveis principais desse processo envolvem o uso de solventes orgânicos, força iônica, alteração do pH e o aumento ou a diminuição da temperatura. Através de combinações dessas variáveis obtêm-se precipitados e sobrenadantes. Esses precipitados/sobrenadantes formam um produto constituído de várias espécies de moléculas e que podem ser removidos por centrifugação e/ou filtração (WARD, 1989). O alvo da precipitação pode ser tanto a molécula de interesse, que pode ser solubilizada após a separação, ou os contaminantes, descartados após a separação.

A precipitação com o uso de sais ocorre pela diminuição da solubilidade da molécula alvo ocasionada pela dissolução do sal, chama de *salting-out*, e

que serve tanto para purificar como para concentrar uma fração específica. Nesse processo os íons competem com os solutos pelas moléculas de água e, quando removida a camada de hidratação, as interações hidrofóbicas tornam-se relevantes e levam à formação do precipitado (WATANABE et al., 2006).

A adição de solventes orgânicos em soluções aquosas diminui a solubilidade das proteínas em pH fixo. A água tende se opor à atração eletrostática entre grupos iônicos de carga opostas devido à constante dielétrica, promovendo, assim, dissociação de espécies iônicas em meio aquoso. Solventes orgânicos, tais como acetona e etanol, tem menor constante dielétrica e sua adição em uma solução aquosa aumenta as forças atrativas entre cargas opostas, gerando agregação e precipitação (WARD, 1991).

2.5.1.4 Cromatografias

A cromatografia é um método físico-químico muito utilizado na separação de compostos entre duas fases: uma fase móvel e uma estacionária. Durante o processo, as moléculas com maior afinidade pela fase estacionária ficam retidas por mais tempo do que aquelas com maior afinidade pela fase móvel, dando-se assim a separação (JANSON; RYDEN, 1990)

A cromatografia de interação hidrofóbica (CIH) separa as moléculas com base nas diferenças de hidrofobicidade (Figura 9). A separação é baseada na interação reversível entre a amostra, em presença de elevada concentração de sal, e a superfície hidrofóbica da fase estacionária. O sal aumenta a entropia da água e conseqüentemente as interações hidrofóbicas, tal como acontece no fenômeno de *salting-out*. Quanto mais hidrofóbica a molécula, mais forte a ligação com as porções hidrofóbicas da coluna.

A cromatografia de troca iônica (CTI) separa as moléculas com base nas diferenças de carga e a interação reversível entre a amostra eletricamente carregada e o meio cromatográfico com carga oposta. As diferentes densidades de carga na superfície das moléculas constituem a base da separação por troca iônica (Figura 9). A cromatografia de troca aniônica (CTA), utilizada nesse trabalho, é realizada com resinas carregadas positivamente, ou seja, adsorvem moléculas com cargas negativas.

A cromatografia de afinidade (CA) estabelece estratégias de purificação rápidas e eficientes, possibilitando alto rendimento com número reduzido de etapas. Essa cromatografia depende apenas de um ligante específico que é acoplado à matriz cromatográfica, podendo explorar quaisquer características particulares da molécula de interesse (Figura 9). Um exemplo de CA é a utilização de proteína A, isolada de células de *Staphylococcus aureus*, que reconhece e se liga à porção Fc da imunoglobulina humana G (IgG), permitindo sua purificação.

Cada cromatografia tem sua condição de eluição própria, entretanto nesse trabalho foi empregada cromatografia negativa, caracterizada pela absorção dos contaminantes na resina enquanto o produto de interesse é coletado na fração não-adsorvida.

Figura 9 - Esquema do princípio de separação das cromatografias discutidas.

A: Cromatografia de interação hidrofóbica; B: Cromatografia de troca iônica; C: Cromatografia de afinidade. Fonte: AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH HANDBOOK

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Desenvolver um processo de purificação do PS14 proveniente de diferentes lotes de caldo fermentado de *S. pneumoniae* sorotipo 14, de forma a alcançar os requerimentos de pureza exigidos pela Organização Mundial da Saúde para o conteúdo de proteínas e ácidos nucleicos e de distribuição da massa molecular (YOTHER; BENTLEY; HENNESSEY JR., 2008; WHO, 2005).

3.2 Específicos

- Avaliar o uso de ácido tricloroacético (TCA) e/ou do detergente catiônico brometo de cetiltrimetilamônio como agentes precipitantes de contaminantes em diferentes etapas da purificação.
- Estabelecer o tamanho dos poros das membranas de ultrafiltração a fim de alcançar o melhor compromisso entre rendimento e pureza.
- Avaliar o uso do detergente docecil sulfato de sódio (SDS) como adjuvante para aumentar a remoção de impurezas através da membrana na ultrafiltração.
- Estabelecer as condições das cromatografias de interação hidrofóbica e troca aniônica.
- Avaliar o tamanho e a distribuição da massa molecular do PS14 após o processo de purificação.

4 MATERIAS E MÉTODOS

4.1 Microrganismo

O microrganismo utilizado foi *S. pneumoniae* sorotipo 14, cepa 5287 fornecida pela sessão de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, previamente selecionada devido à maior produção de PS14 (GOGOLA et al., 2012).

4.2 Cultivo e separação inicial

Os cultivos foram realizados com condições e meios de cultura diferentes. Os cultivos contínuos e descontínuos com meio quimicamente definido foram feitos em reator R'ALF Plus (Bioengineering) com dorna de 1 L de capacidade com 500 mL dentro do reator (SILVA, 2013). Os cultivos descontínuos com meio de cultura complexo foram realizados em reator BioFlo 2000 (New Brunswick Scientific) com dorna de 5,5 L de capacidade, contendo 5 L de meio (GOGOLA-KOLLING et al., 2014). Todos os cultivos foram feitos em anaerobiose, pH controlado a 7,5 e 37 °C. Foram realizados 9 processos de purificação do PS14 obtido em diferentes lotes de caldo fermentado, como descrito na Tabela 1.

Tabela 1 - Cultivos de *Streptococcus pneumoniae* realizados para a produção e purificação do PS14

Cultivo	Condições	Purificação
1	Contínuo – Meio Definido	1
2	Batelada – Meio Definido	2
3	Contínuo – Meio Definido	<u>3*</u> , 4, 5, <u>6*</u> , <u>8*</u>
4	Batelada – Meio Complexo	7
5	Batelada – Meio Complexo	9

* *pool* dos concentrados provenientes de diferentes recipientes coletados durante o cultivo contínuo

4.3 Purificação do PS

Nesse trabalho, diferentes processos de purificação do polissacarídeo de *Streptococcus pneumoniae* do sorotipo 14 foram avaliados conforme mostra a Figura 10.

Figura 10 - Panorama geral dos processos avaliados para purificação do PS14

4.3.1 Etapas iniciais: Separação celular e concentração

Após o cultivo, a primeira etapa do processo de purificação consistiu na inativação do caldo fermentado com 0,05% (p/v) de timerosal durante aproximadamente 18 h. A separação celular foi feita por microfiltração tangencial em membrana de 0,22 μm (cassete Pellicon 0,5 m^2 , Millipore). O volume do concentrado de células foi reduzido até aproximadamente 1/10 do volume final do cultivo e lavado com 6 volumes de cloreto de sódio 0,9%.

O microfiltrado obtido foi concentrado em membrana de ultrafiltração tangencial com poros de 50 kDa de corte nominal, com 0,55 m^2 de área filtrante (membrana espiral de polietersulfona, Prep/Scale, Millipore) ou em membrana de ultrafiltração tangencial com poros de 30 kDa de corte nominal, com 0,23 m^2 de área filtrante (membrana espiral de polietersulfona, Prep/Scale, Millipore), a fim de se reduzir o volume de trabalho em até 1/10 do volume final do cultivo. Após a concentração, foi realizada diafiltração com cloreto de sódio a 0,9% com 10 vezes o volume do concentrado para remover as moléculas menores que 30 kDa/ 50 kDa, como moléculas de substrato e produtos do metabolismo (Figura 11). As condições de trabalho da concentração e diafiltração, sistema composto pela membrana Prep/Scale e bomba Cole-Palmer (77601-10), mantiveram pressão de entrada e saída igual a 5 psi e pressão transmembrana de 5 psi.

O concentrado foi armazenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e usado em diferentes estratégias de purificação, que envolveram a realização de passos independentes para que ocorresse o enriquecimento de PS14 e a eliminação de contaminantes.

Figura 11 - Representação esquemática das etapas iniciais do processo de purificação do PS14.

4.3.2 Precipitação alcoólica a 20%

A precipitação alcoólica de contaminantes foi realizada de acordo com o descrito pelo Instituto Merieux (1980). À fração contendo PS14 foi adicionado, primeiramente, acetato de sódio de forma a obter a concentração final de 5% (m/v). O pH da amostra foi ajustado para 5,4 com ácido acético e então foi adicionado, sob agitação, etanol até a concentração final de 20% (v/v). A precipitação ocorreu a 4 °C ou 25 °C (dependendo da proposta da purificação) por 18 h. Decorrido este período, a amostra foi centrifugada a 17.696 g, 4 °C ou 25 °C, por 45 minutos. O precipitado, representado em sua maioria por proteínas e ácidos nucleicos, foi eliminado, e o sobrenadante contendo PS14 foi submetido à segunda precipitação com etanol.

4.3.3 Precipitação alcoólica a 60%

A precipitação de PS14 com etanol a 60% também foi realizada de acordo com Instituto Merieux (1980). Ao sobrenadante da precipitação alcoólica a 20%

foi adicionado acetato de sódio até 8% (p/v), o pH foi ajustado para 5,8 com ácido acético e então foi acrescentado etanol até a concentração final de 60% (v/v). Após 18 h, a 4 °C ou 25 °C (dependendo da proposta da purificação), a amostra foi centrifugada nas mesmas condições da etapa de precipitação a 20%. O sobrenadante contendo a maior parte de contaminantes foi eliminado e o precipitado enriquecido em PS14 foi solubilizado em água.

4.3.4 Solubilização em água

O produto da precipitação alcoólica a 60% foi solubilizado em água sob agitação por 18 h, a 20 °C. O material foi centrifugado a 17.696 g, 4 °C por 45 min para retirar restos de ácidos nucleicos e proteínas que ficaram irreversivelmente desnaturados em decorrência do tratamento alcoólico e o PS14 solúvel em água foi obtido no sobrenadante.

4.3.5 Tratamento com detergente catiônico brometo de cetiltrimetilamônio (Cetavlon)

O detergente Cetavlon foi adicionado ao solubilizado da precipitação alcoólica a 60% (item 3.3.4.), sob agitação, para uma concentração final de 0,1% (m/v) e após repouso em temperatura ambiente, permaneceu a 4 °C por 18 h. Por ser um detergente catiônico, ele se liga às moléculas de carga negativa formando um complexo e precipitando; o PS14 por não possuir carga foi recuperado no sobrenadante. Uma segunda precipitação alcoólica a 60% (item 3.3.3.) foi necessária para retirar os restos do detergente da amostra, pois Cetavlon é bastante solúvel em etanol.

4.3.6 Concentração em membrana de 30 kDa ou 50 kDa

A concentração e diafiltração das amostras foi realizada em sistema *LabScale* com três membranas de 30 kDa (Pellicon XL, PLCTK 30 K, Celulose Regenerada, 50 cm², Millipore) ou 50 kDa (Pellicon XL, Biomax 50 K, Polietersulfona, 50 cm², Millipore), que consiste em um sistema de ultrafiltração tangencial, próprio para volumes pequenos (Figura 12). O PS14 foi concentrado e diafiltrado a partir de um sistema de recirculação, ficando retido no reservatório, e as moléculas menores que o poro da membrana foram eliminadas no ultrafiltrado.

Figura 12 - Sistema *LabScale* usado nas etapas de diafiltração das amostras

4.3.7 Tratamento com dodecil sulfato de sódio (SDS) a 0,5%

Foram utilizadas sequencialmente as seguintes soluções para diafiltração em *LabScale* (item 3.3.6.): SDS 0,5% (p/v), em tampão Tris 25 mM contendo ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) 2 mM, salina 0,9% (p/v) em Tris 25 mM e por fim Tris 25 mM, todas as soluções em pH 7,0. A diafiltração foi feita empregando seis vezes o volume do concentrado para cada solução.

4.3.8 Precipitação de contaminantes com ácido tricloroacético (TCA)

O solubilizado de 60% (item 3.3.4) foi submetido à precipitação com diferentes concentrações de TCA, a fim de verificar a maior eliminação de proteínas no precipitado, tal como anteriormente descrito por Saeed e Thomassen (1982), além de ácidos nucleicos, e recuperação do PS14 no sobrenadante. As quatro concentrações de TCA testadas (0,5%, 1%, 5%, 10%) foram adicionadas à amostra que permaneceu em banho de gelo por 30 min e logo após foi centrifugada a 17.696 g, a 4 °C por 1 h. O sobrenadante contendo o PS14 foi então rapidamente neutralizado com hidróxido de sódio 5 M (pH final entre 6-7) e o precipitado representado por contaminantes foi eliminado.

A concentração ótima de TCA foi então empregada em etapas distintas nos processos de purificação subsequentes com a finalidade de determinar qual a melhor sequência de etapas (Figura 10), de modo a obter elevada pureza com a maior recuperação possível.

4.3.9 Cromatografia de Interação Hidrofóbica (CIH)

A CIH foi realizada em resina Phenyl-Sepharose empacotada em uma coluna com volume de 12 mL ($\varnothing = 0,8$ cm; Lc = 6 cm), acoplada a um cromatógrafo Äkta Explorer (GE Lifescience), com fluxo de 5 mL/min. O equilíbrio da resina foi feito com 5 volume de coluna (VC) de uma solução de 2 M de sulfato de amônio em tampão fosfato de sódio 10 mM pH 7,0. A amostra também foi ajustada para pH 7,0 e 2 M de sulfato de amônio foi adicionado. Após a passagem da amostra pela coluna, a resina foi lavada com 5 VC da mesma solução de sulfato de amônio. A eluição foi feita com 5 VC de um gradiente decrescente (100% a 0%) de sulfato de amônio em tampão fosfato de sódio 10 mM pH 7,0.

4.3.10 Cromatografia de Troca Aniônica em Q-Sepharose (CTA)

A CTA foi realizada em coluna HiTrapTM Q-Sepharose Fast Flow 1ml (GE Lifescience) (Figura 13) acoplada a um cromatógrafo Äkta Avant 150 (GE Lifescience).

Figura 13 - Coluna HiTrap Q-Sepharose 1ml (esquerda) e cromatógrafo Äkta Avant 150 utilizado nos processos cromatográficos (direita).

O VC foi de 1 mL e o fluxo de trabalho foi de 1 mL/min. A resina foi equilibrada com 20 VC de tampão fosfato 10 mM pH 7,5 e reequilibrada com 20 VC da mesma solução após a aplicação da amostra. A amostra aplicada à resina teve o pH ajustado para 8,0.

O PS14 foi recolhido na fração não-adsorvida e a limpeza da coluna foi feita com 20 VC de hidróxido de sódio 100 mM.

4.3.11 Cromatografia de Adsorção em Batelada

A cromatografia de adsorção foi realizada com resina de Q-Sepharose Fast Flow e um sistema de filtração a vácuo para separar a amostra da resina. A resina foi equilibrada com 10 mM de tampão fosfato em pH 8,0 e o pH da amostra foi ajustado para pH 8,5. A amostra foi adicionada à resina em um tubo Falcon de 50 mL e a suspensão foi homogeneizada durante 20 minutos a 100 rpm. Em seguida a suspensão foi filtrada, a amostra recolhida na fração não-adsorvida e a resina ficou retida no filtro. O processo de homogeneização e filtração foi repetido por mais três vezes.

4.3.12 Liofilização

O PS14 purificado foi congelado a -80 °C e liofilizado para a retirada de água (liofilizador ModulyoD 115 – Freeze Dryer, Thermo Electron Corporation).

4.4 Métodos Analíticos

A concentração do PS14 foi determinada para o acompanhamento do rendimento das etapas de purificação, sendo a dosagem feita pelo método de ELISA de captura (GOGOLA et al., 2012). As concentrações de proteínas totais e ácidos nucleicos foram verificadas para acompanhamento da eficiência das etapas de purificação; a primeira foi determinada pelo método de Lowry et al., (1951) utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão e, na segunda, a concentração foi medida pela absorbância a 260nm (A260nm) considerando 1 unidade de A260nm igual a 50 µg/mL de ácidos nucleicos.

A determinação da massa molecular e a distribuição de tamanho do PS14 purificado foi realizada por dois métodos, ambos feitos pelo Laboratório de Imunobiotecnologia do Instituto Butantan. O primeiro método foi realizado por gel filtração em coluna Sephacryl S-400 (GE Healthcare, Uppsala Sweden), sendo que a faixa ideal de separação da coluna varia entre 10 kDa e 2000 kDa; o perfil de eluição foi determinado pela dosagem de açúcares totais pelo método colorimétrico de fenol sulfúrico (DUBOIS et al., 1956), cuja leitura foi realizada a 490 nm.

O segundo método empregado para determinação da massa molecular foi a cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular (CLAE-EM), utilizando-se duas colunas TSK Gel GMPWxL (TOSOH Bioscience) em série, a

35 °C e com fluxo de 0,4 mL.min⁻¹. Como fase móvel, foi usada uma solução de 10 mM de fosfato em 0,15 M de cloreto de sódio, sendo pH ajustado para 7,5; as leituras foram feitas por um detector de índice de refração (RID- G1362A – Agilent). Os tempos de eluição das frações de PS14 foram transformados em valores de massa molecular, em kDa, através da construção de uma curva padrão a partir de dextranas de massa conhecida. Amostras de dextranas de 12, 25, 50, 150, 270 e 410 kDa foram aplicadas à coluna, e o logaritmo do tempo de retenção médio dos picos de eluição foram correlacionados com os valores de massa molecular através de uma relação linear.

4.5 Análise dos Resultados

Tabelas e gráficos foram feitos para avaliar os processos de purificação. Os valores das variáveis foram obtidos de acordo com as equações abaixo:

- PS14 total (mg):

$$PS14 = \frac{C_{PS} \times V}{1000}$$

Sendo C_{PS} a concentração de polissacarídeo (µg/ml) e V o volume da fração (mL);

- Proteína total, P(mg):

$$P = \frac{C_P \times V}{1000}$$

Sendo C_P a concentração de proteínas (µg/ml) e V o volume da fração (mL);

- Ácido Nucleico total, An (mg):

$$An = \frac{C_{An} \times V}{1000}$$

Sendo C_{An} a concentração de ácidos nucleicos (µg/ml) e V o volume da fração (mL);

- Recuperação Global, RcG (%):

$$RcG (\%) = \frac{PS14_n \times 100}{PS14_i}$$

Sendo PS14_i a quantidade de PS14 (mg) da fração inicial e PS14_n refere-se à quantidade de PS14 (mg) da etapa em questão;

- Recuperação por Etapa, RcE (%):

$$RcE \% = \frac{PS14_{n+1} \times 100}{PS14_n}$$

Sendo $PS14_{n+1}$ a quantidade de PS14 (mg) em relação a quantidade de PS14 da etapa anterior ($PS14_n$);

- Pureza relativa em relação às proteínas, PRprot:

$$PR_{prot} = \frac{PS14}{P}$$

Sendo PS14 a quantidade de PS14 (mg) e P a quantidade de proteínas (mg), na etapa. A OMS exige que a pureza em relação às proteínas seja igual ou menor que 3%, isto é, para cada 100 mg de PS14 não pode haver mais do que 3 mg de proteínas. Deste modo, a PRprot calculada deve ser maior que 33 mg PS14/mg proteínas.

- Pureza relativa em relação aos ácidos nucleicos, PRan:

$$PR_{an} = \frac{PS14}{An}$$

Sendo PS14 a quantidade de PS14 (mg) e An a quantidade de ácidos nucleicos (mg), na etapa. A OMS exige que a pureza em relação aos ácidos nucleicos seja igual ou menor que 2%, isto é, para cada 100 mg de PS14 não pode haver mais do que 2 mg de ácidos nucleicos. Deste modo, a PRan calculada deve ser maior que 50 mg PS14/mg ácidos nucleicos.

- Fator de Purificação Global, (FPg):

$$FP = \frac{PR_i}{PR_n}$$

Sendo PR_i a pureza relativa da fração inicial e PR_n a pureza relativa da etapa em questão;

- Fator de Purificação por etapa, (FPe):

$$FPe = \frac{PR_{n+1}}{PR_n}$$

Sendo PR_{n+1} a pureza relativa da fração em questão em relação a pureza relativa da etapa anterior (PR_n)

5 RESULTADOS

5.1 Processo de Purificação 1

O processo de purificação 1 seguiu o esquema geral das purificações desenvolvidas pelo Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan para polissacarídeos capsulares de outros microrganismos (GONÇALVES et al., 2003, 2007; TAKAGI et al., 2008; TANIZAKI et al., 1996). As etapas de precipitação alcoólica foram realizadas de acordo com a patente do Instituto Merieux (1980). A purificação iniciou-se com a inativação do cultivo com timerosal, seguido de microfiltração tangencial para separação das células e concentração do microfiltrado em membrana de 50 kDa, como esquematizado na Figura 11. Após essas etapas iniciais de purificação, o concentrado foi precipitado com 20% de etanol, sendo o sobrenadante recuperado por centrifugação após 18 h em repouso a 4 °C. Ao sobrenadante foi então adicionado 60% de etanol e o precipitado obtido, após as mesmas condições de repouso e centrifugação da etapa anterior, foi solubilizado em água. Após a solubilização, parte da amostra foi precipitada com Cetavlon e seguiu para uma nova precipitação alcoólica a 60% e parte foi precipitada com diferentes concentrações de TCA. As amostras resultantes das melhores condições da precipitação com TCA foram concentradas em membrana de 30 kDa Centriprep (YM – 30, Celulose Regenerada, 15 mL, Millipore) para remoção do ácido (Figura 14).

Figura 14 - Fluxograma das etapas do processo de purificação 1

Precip. = precipitação; EtOH = etanol; Solub. Ppt = solubilização do precipitado com água destilada; 2 Precip. = segunda precipitação; TCA = ácido tricloroacético; [30 kDa] = concentração em membrana de 30 kDa

A Figura 15 mostra a pureza relativa do PS14 em relação a proteínas e ácidos nucleicos e a porcentagem de recuperação global do PS14. Pode-se observar que a etapa de concentração em membrana de 50 kDa levou à recuperação de 100% do PS14 existente no microfiltrado; a pureza relativa do PS14 foi de 4,3 e 0,7 em relação aos ácidos nucleicos e proteínas, respectivamente, e nessa etapa obteve-se o maior fator de purificação em relação aos ácidos nucleicos (19) (Tabela 2), eliminando 94% desse contaminante. Após as etapas de precipitação alcoólica (20% e 60% de etanol) e solubilização do precipitado de 60%, foi recuperado 77% do PS14 com pureza relativa em relação aos ácidos nucleicos de 38 e 5,2 em relação a proteínas, ambos abaixo do grau de pureza exigido (Figura 15).

Figura 15 - Recuperação global do PS14 e pureza relativa em relação aos ácidos nucleicos e proteínas ao longo das etapas do processo de purificação 1.

O tracejado verde representa o limiar da pureza relativa requerida em relação aos ácidos nucleicos e o tracejado rosa representa o limiar da pureza relativa requerida em relação às proteínas.

Os métodos de dosagens de proteínas e ácidos nucleicos sofreram interferência da amostra tratada com Cetavlon, entretanto a interferência foi eliminada com a precipitação alcoólica, já que o detergente é solúvel em álcool. Após essa etapa, observou-se diminuição considerável dos contaminantes, alcançando assim a pureza relativa requerida em relação aos ácidos nucleicos, ficando próxima ao limite exigido (54), porém abaixo do recomendado para proteínas (21).

A precipitação com concentrações de TCA de 5% e 10% proporcionou resultados melhores do que 0,5% e 1%. Essas duas concentrações seguiram para a etapa de concentração em membrana de 30 kDa e, devido ao seu pequeno volume, o dispositivo Centriprep foi utilizado. A concentração da amostra de TCA 5% alcançou a pureza relativa tanto para ácidos nucleicos quanto para proteínas (50 e 35, respectivamente) e a recuperação final do PS14 foi de 25%. A concentração da amostra de TCA 10% alcançou a pureza

apenas para proteínas (46), enquanto para ácidos nucleicos ficou abaixo do limite exigido (24) e a recuperação global do PS14 foi de 29%.

Tabela 2- Tabela do processo de purificação 1

Amostra	PS14 Total (mg)	Ac. Nucleico Total (mg)	Fator de Purificação Etapa (AN)	Fator de Purificação Global (AN)	Proteína Total (mg)	Fator de Purificação Etapa (Prt)	Fator de Purificação Global (Prt)
Microfiltrado 0.22	1290	5776	1	1	16474	1	1
[50 kDa]	1288	302	19	19	1935	8,5	8,5
Solub. EtOH 20%	1037	178	1,4	26	592	2,6	22
Solub. Ppt 60%	996	26	6,5	168	191	3,0	67
Cetavlon	318	15	1,7	63	134	1,4	7,1
2 Solub. Ppt 60%	236	4,4	2,5	161	11	9,0	64
TCA 0,5%	83	2,0	14	510	14	14	71
TCA 1%	91	2,2	13	504	13	17	86
TCA 5%	70	4,0	5,6	209	1,6	100	524
TCA 10%	67	9,6	2,2	84	2,3	69	358
[30kDa] TCA 5%	27	0,6	2,9	600	0,8	0,8	421
[30kDa] TCA 10%	31	1,3	3,5	291	0,7	1,5	548

O PS14 das amostras que foram tratadas com 5% de TCA e com Cetavlon foi eluído no volume de exclusão da coluna Sephacryl S-400, conseqüentemente, a massa molecular do PS14 obtida foi > 2000 kDa, portanto acima do valor mínimo requerido pelos órgãos regulatórios (Figura 16).

Figura 16 - Distribuição do tamanho do PS14 purificado no processo 1

Perfil determinado por gel filtração em coluna Sephacryl S-400 e detecção pelo método fenol-sulfúrico (leitura a 490 nm).

O processo de purificação 1 alcançou a pureza relativa em relação às proteínas e ácidos nucleicos somente após a etapa de concentração em 30 kDa da amostra precipitada com 5% de TCA, porém com baixa recuperação de PS14. Acredita-se que a baixa recuperação nessa etapa tenha sido devida ao rompimento da membrana do sistema de concentração, o que levou a diversas manipulações e trocas da membrana, provavelmente por incompatibilidade química do Centriprep com TCA. Desse modo, a concentração ótima de TCA para precipitação de contaminantes foi de 5%, pois apresentou o maior fator de purificação tanto para ácidos nucleicos como para proteínas (comparando com a amostra precipitada com 10% de TCA) e o maior fator de purificação do processo para proteínas (Tabela 2). Podemos analisar, pelo perfil do PS14, que o meio ácido proporcionado pelo TCA, quando comparado com o de Cetavlon, não foi suficiente para hidrolisar o polissacarídeo e reduzir sua massa molar (Figura 16), viabilizando assim seu uso nas purificações seguintes.

O uso do Cetavlon foi descartado para as purificações posteriores, pois, embora tenha melhorado a pureza da amostra e a recuperação tenha sido razoavelmente alta (Figura 15), não foi suficiente para atingir a pureza para proteínas.

5.2 Processo de Purificação 2

A Figura 17 descreve as operações realizadas durante o processo de purificação 2. Essa purificação teve as mesmas etapas do processo de purificação 1, que consistiu das etapas iniciais, precipitações com 20 e 60% de etanol e precipitação com 5% de TCA. Logo após foi testada uma nova precipitação alcoólica a 60% para remover TCA em lugar da concentração em membrana Centriprep. O solubilizado dessa segunda precipitação com 60% de etanol foi equilibrado com tampão adequado e aplicado em uma coluna cromatográfica de interação hidrofóbica Phenyl-Sepharose. O PS14 por ser hidrofílico não foi capaz de interagir com o ligante hidrofóbico da resina, sendo então recuperado na fração não-adsorvida; já as proteínas e ácidos nucleicos adsorveram devido à presença de grupos hidrofóbicos em ambas as moléculas.

Figura 17 – Fluxograma das etapas do processo de purificação 2

Precip. = precipitação; EtOH = Etanol; Solub. Ppt = solubilização do precipitado com água destilada; TCA = ácido tricloroacético; 2 Precip. = segunda precipitação; CIH = cromatografia de interação hidrofóbica

Nessa purificação podemos observar que a pureza relativa do PS14 em relação aos contaminantes nucleicos e proteicos permaneceu menor durante todo o processo quando comparado com as mesmas etapas da purificação 1 (Figura 18), isso poderia ser explicado pelas condições em que os cultivos foram realizados, contínuo na purificação 1 e descontínuo na purificação 2. Após a precipitação com TCA 5%, notou-se aumento da pureza em relação às proteínas, com a eliminação de 90% desse contaminante em relação à etapa anterior (Solub. Ppt 60%) e o maior fator de purificação por etapa (8,1) (Tabela 3). A segunda etapa de precipitação com 60% etanol foi essencial para retirar os restos de TCA presentes na amostra, eliminando também aproximadamente 70% dos ácidos nucleicos em relação à etapa anterior. Nessa etapa da purificação a pureza relativa do PS14 ainda não tinha sido alcançada (22 para ácidos nucleicos e 20 para proteínas), sendo assim necessário incluir mais uma operação no processo. A etapa cromatográfica eliminou os contaminantes ainda presentes na amostra, garantindo alcançar a pureza relativa requerida: 57 para ácidos nucleicos e 44 para proteínas. A recuperação global de PS14 no final da purificação foi de 40%.

Figura 18 – Recuperação global do PS14 e pureza relativa em relação aos ácidos nucleicos e proteínas ao longo das etapas do processo de purificação 2.

O tracejado verde representa o limiar da pureza relativa requerida em relação aos ácidos nucleicos e o tracejado rosa representa o limiar da pureza relativa requerida em relação aos ácidos nucleicos.

Tabela 3 - Tabela do processo de purificação 2

Amostra	PS14 Total (mg)	Ac. Nucleico Total (mg)	Fator de Purificação por Etapa NA	Fator de Purificação Global NA	Proteína Total (mg)	Fator de Purificação por Etapa Prt	Fator de Purificação Global Prt
[50KDa]	925	781	1	1	2929	1	1
EtOH 20%	655	654	0,8	0,8	1144	1,8	1,8
Solub. Ppt 60%	599	45	13	11	216	4,8	8,8
TCA 5%	488	65	0,6	6,3	22	8,1	71
2 Solub. Ppt 60%	414	19	2,9	18	21	0,9	63
CIH	373	6,6	2,6	48	8,4	2,2	141

A massa molecular do PS14 no final do processo, determinada em coluna cromatográfica Sephacryl S-400, também foi acima do valor mínimo requerido (Figura 19).

Figura 19 - Distribuição do tamanho do PS14 purificado no processo 2

Perfil determinado por gel filtração em coluna Sephacryl S-400 e detecção pelo método fenol-sulfúrico (leitura a 490 nm).

O processo de purificação 2 mostrou-se eficiente, pois alcançou a pureza tanto para ácidos nucleicos quanto para proteínas. O uso do TCA como agente precipitante de proteínas mostrou-se promissor para as próximas purificações, porém a segunda precipitação com etanol seguida da cromatografia resultou em perda de 24% de PS14 em relação à quantidade presente no sobrenadante de TCA 5%.

Como é necessário eliminar o TCA ainda restante no sobrenadante enriquecido em PS14, foi testado o uso desse reagente logo após as etapas iniciais do processo de purificação, eliminando assim a necessidade de uma etapa adicional de precipitação alcoólica após a precipitação com TCA, diminuindo o número de etapas do processo e consequentemente aumentando a recuperação do polissacarídeo.

5.3 Processo de purificação 3

A proposta dessa purificação (Figura 20) foi precipitar o concentrado de 50 kDa das etapas iniciais do processo (Figura 11) com 5% de TCA. O sobrenadante dessa precipitação seguiu para as etapas de precipitação alcoólica e solubilização do precipitado já estabelecidas nas purificações anteriores.

Figura 20 - Fluxograma das etapas do processo de purificação 3

TCA = ácido tricloroacético; EtOH = etanol; Precip. = precipitação; Solub. Ppt = solubilização do precipitado com água destilada

No concentrado de 50 kDa a pureza relativa para ácidos nucleicos era de 1,3 e para proteínas de 0,3 (Figura 21). Após a precipitação com TCA esses valores aumentaram para 1,6 em relação aos ácidos nucleicos e para 3,6 em relação às proteínas, eliminando 25% e 91% desses contaminantes,

respectivamente. Essa etapa teve recuperação do polissacarídeo de 93%. A precipitação do sobrenadante de TCA com 20% de etanol pouco ajudou para aumentar a pureza em relação aos ácidos nucleicos e podemos observar que a medida da concentração proteica foi maior do que na fração anterior, indicando que a presença de TCA e/ou etanol poderia interferir no método de dosagem de proteínas (Tabela 4).

A solubilização do precipitado de 60% apresentou o maior fator de purificação por etapa (21) para ácidos nucleicos, no entanto a pureza relativa foi de 30, não alcançando o valor requerido, e de 35 para proteínas, atingindo a pureza necessária, porém próxima do limite exigido. A recuperação final desse processo de purificação foi de 72%, muito maior do que os valores encontrados anteriormente nas purificações usando TCA após as etapas de precipitação alcoólica.

Figura 21 – Recuperação global do PS14 e Pureza Relativa em relação aos ácidos nucleicos e proteínas ao longo das etapas do processo de purificação 4

O tracejado roxo representa o limiar da pureza relativa requerida em relação aos ácidos nucleicos e o tracejado rosa representa o limiar da pureza relativa requerida em relação às proteínas.

Tabela 4 - Tabela do processo de purificação 4

Amostra	PS14 Total (mg)	Ac. Nucleicos Total (mg)	Fator de purificação por etapa AN	Fator de purificação Global	Proteínas Total (mg)	Fator de Purificação por etapa Prt	Fator de Purificação Global
[50kDa]	139	106	1	1	425	1	1
TCA 5%	129	79	1,2	1,2	36	11	11
Sobrenadante 20%	111	79	0,9	1,1	62	0,5	5
Solubilizado 60%	100	3,4	21	22	2,9	20	107

A massa molecular média do polissacarídeo foi acima do valor mínimo requerido quando determinada na coluna Sephacryl S-400 (Figura 22).

Figura 22 - Distribuição do tamanho do PS14 purificado no processo 3

Perfil determinado por gel filtração em coluna Sephacryl S-400 e detecção pelo método fenol-sulfúrico (leitura a 490 nm).

A purificação realizada alterando a ordem das precipitações não alcançou a pureza requerida para ácidos nucleicos. Entretanto, o uso de TCA no começo do processo evitou incluir etapas no final da purificação apenas para eliminá-lo, o que resultou então em aumento da recuperação final.

Com os resultados divergindo entre a pureza e recuperação em cada purificação (purificações 2 e 3), nós decidimos avaliar outra metodologia para os processos de purificação seguintes, incluindo o uso de detergente durante a diafiltração em membrana de *LabScale*, na expectativa de que o detergente

auxiliasse a eliminar parte dos contaminantes pelos poros da membrana durante a diafiltração com diferentes tampões.

5.4 Processo de purificação 4 e 5

Em nosso laboratório, resultados satisfatórios foram obtidos nos processos de purificação realizados empregando o detergente SDS durante as etapas de diafiltração do polissacarídeo capsular de *Haemophilus influenzae* tipo b (DR. JOAQUIN CABRERA-CRESPO, comunicação pessoal). O SDS é um detergente aniônico e foi empregado para facilitar a eliminação de componentes de baixa massa molecular através das membranas de 50 kDa.

Os processos de purificação 4 e 5 tiveram as mesmas etapas, por isso serão avaliados em conjunto. Além disso, os dois processos seguiram com a temperatura mais alta durante as etapas de precipitação e centrifugação que os processos anteriores, 25 °C ao invés de 4 °C, isso por que o SDS cristaliza quando as amostras permanecem em baixas temperaturas. Dessa forma, o possível arraste do PS14 para o precipitado seria evitado e o manuseio da amostra, facilitado.

A purificação, devido ao volume do cultivo, iniciou-se com a microfiltração e a concentração em membrana de 50 kDa (Figura 11) e depois seguiu para as etapas de diafiltração em *LabScale* com diferentes tampões. Após esse processo, a amostra diafiltrada seguiu para as etapas de precipitação alcoólica e solubilização (Figura 23).

Figura 23 - Fluxograma das etapas do processo de purificação 4 e 5

50 kDa = membrana de ultrafiltração tangencial de 50 kDa; EtOH = etanol; Precip. = precipitação; Solub. Ppt = solubilização do precipitado com água destilada

Apesar de serem do mesmo cultivo contínuo, a amostra inicial do concentrado de 50 kDa da purificação 4 tinha pureza relativamente maior em relação aos ácidos nucleicos e proteínas que a mesma amostra da purificação 5 (4,3 e 1,0 contra 3,7 e 0,7, respectivamente) (Tabela 5). Isso ocorreu porque o caldo fermentado recolhido na saída do reator para cada um desses processos foi obtido em condições distintas de estado estacionário durante a operação contínua.

Tabela 5 - Comparação da pureza relativa em relação aos ácidos nucleicos e proteínas dos processos de purificação 4 e 5.

Amostra	Processo de Purificação 4		Processo de Purificação 5	
	PS14/AN	PS14/Prt	PS14/AN	PS14/Prt
[50kDa]	4,3	1,0	3,7	0,7
[50kDa] + SDS	11	1,7	5,3	0,5
Sobren. EtOH 20%	17	17	6,7	1,6
Solub. Ppt 60%	50	145	8,1	23

Em azul os valores que atingiram a pureza requerida em vermelho os valores que não atingiram a pureza requerida na etapa final do processo

Após a etapa de concentração e diafiltração com SDS, o processo de purificação 4 eliminou 74% dos ácidos nucleicos e 58% de proteínas, com uma perda de 30% do polissacarídeo (Figura 24). Já o processo de purificação 5 eliminou 58% dos ácidos nucleicos, sendo o maior fator de purificação por etapa (1,4) (Tabela 6), e 28% das proteínas, com perda de 41% do polissacarídeo. Além disso, o SDS juntamente com a primeira precipitação alcoólica parece ter contribuído para desnaturar as proteínas, separar as fitas de DNA e assim facilitar a precipitação destes compostos por etanol, eliminando aproximadamente 35% dos ácidos nucleicos em ambos os processos e 91% de proteínas no processo de purificação 4, com o maior fator de purificação (10), e 73% no processo de purificação 5. Nessa etapa, a pureza relativa para ácidos nucleicos e proteínas foi de 17 na purificação 4 e na purificação 5 a pureza relativa foi de 6,7 para ácidos nucleicos e 1,6 para proteínas.

Figura 24 – Comparação da recuperação do PS14 nos processos de purificação 4 e 5

Após a solubilização do precipitado de 60%, a pureza relativa no processo de purificação 4 foi de 50 para ácidos nucleicos, eliminando 70% desse contaminante com o maior fator de purificação por etapa do processo (3,0) (Tabela 5), e de 145 para proteínas, alcançando os valores requeridos para os dois contaminantes e com uma recuperação global de 60% do polissacarídeo. Já o processo de purificação 5, após a mesma etapa,

apresentou 8,1 de pureza relativa para ácidos nucleicos e 23 para proteínas, com o maior fator de purificação do processo (14) (Tabela 6), eliminando 93% desse contaminante, com recuperação final de 47%.

Tabela 6 - Comparação entre o fator de purificação por etapa em relação aos ácidos nucleicos e proteínas dos processos de purificação 4 e 5

Amostra	Fator de Purificação por Etapa NA		Fator de Purificação Etapa Prt	
	Processo de Purificação 4	Processo de Purificação 5	Processo de Purificação 4	Processo de Purificação 5
[50kDa]	1	1	1,0	1
[50kDa] + SDS	2,7	1,4	1,7	0,8
Sobren. EtOH 20%	1,5	1,3	10	3,0
Solub. Ppt 60%	3,0	1,2	8,5	14

A massa molecular média das purificações 4 e 5, determinadas por CLAE-EM, foi de 1077 kDa e 1008 kDa, respectivamente (Figura 25).

Figura 25 - Distribuição do tamanho do PS14 purificado nos processos 4 e 5

Perfil determinado por cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular (CLAE-EM)

O emprego do SDS na diafiltração em membrana de ultrafiltração de 50 kDa permitiu que agregados de proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos pudessem ser desagregados e dessa forma facilitou a ação do etanol na

eliminação desses contaminantes nas etapas subsequentes. Entretanto, esse processo não garantiu a pureza do polissacarídeo oriundo de diferentes materiais de partida, sendo assim necessária uma nova estratégia de purificação.

5.5 Processo de purificação 6

A purificação 6 foi realizada em duplicata a partir do mesmo material de partida. Neste processo a etapa de precipitação com TCA 5% foi reintroduzida, pois os resultados dos processos de purificação 4 e 5 mostraram que seria necessário incluir uma etapa adicional para garantir a pureza final do PS14 independentemente de variações no cultivo.

Após as etapas iniciais do processo de purificação, a amostra foi diafiltrada com SDS em membrana de 50 kDa. Logo após a diafiltração, foi realizada uma etapa de precipitação do concentrado com 5% de TCA. O sobrenadante dessa precipitação seguiu para as precipitações alcoólicas de 20 e 60% (Figura 26).

Figura 26 - Fluxograma das etapas do processo de purificação 6

50 kDa = membrana de ultrafiltração de 50 kDa; EtOH = etanol; TCA = ácido tricloroacético; Precip. = precipitação; Solub. Ppt = solubilização do precipitado em água destilada

A purificação 6, realizada com amostra do cultivo contínuo com meio definido, apresentou pureza relativa de 1,3 para ácidos nucleicos e 0,5 para proteínas no concentrado de 50 kDa da etapa inicial. Após a etapa de diafiltração esses valores foram 2,1 e 0,3, respectivamente (Figura 27). A diminuição da pureza relativa para proteínas poderia ser explicada pelo baixo fator de purificação da etapa (0,6) (que eliminou apenas 6% de proteínas) e a grande perda de PS14 pelos poros da membrana (43%).

Figura 27 – Recuperação global do PS14 e pureza relativa em relação aos ácidos nucleicos e proteínas ao longo das etapas do processo de purificação 6.

Média e desvio padrão de 2 experimentos independentes. O tracejado verde representa o limiar da pureza relativa requerida em relação aos ácidos nucleicos e o tracejado rosa representa o limiar da pureza relativa requerida em relação às proteínas

Com a precipitação dos contaminantes do concentrado de 50 kDa + SDS com TCA 5%, 65% dos ácidos nucleicos e 91% das proteínas foram eliminados, com fator de purificação de 10 (Tabela 7), aumentando a pureza relativa do polissacarídeo para 5,1 e 2,9, respectivamente. Nessa etapa, 14% do polissacarídeo foi perdido em relação à etapa anterior e a recuperação foi de apenas 50% em relação à amostra inicial. A precipitação alcoólica a 20% não foi capaz de aumentar a pureza em relação aos ácidos nucleicos e em relação às proteínas aumentou para 4,9, bem abaixo dos valores requeridos de pureza (Figura 27). A etapa de precipitação alcoólica a 60% teve o fator de purificação de 12 para ácidos nucleicos e 11 para proteínas, sendo a etapa que

mais contribuiu com o aumento da pureza do PS14 (Tabela 7), eliminando 98% de ácidos nucleicos e 92% de proteínas e alcançando a pureza relativa requerida (63 e 59, respectivamente) (Figura 27). As etapas de precipitação alcoólica tiveram recuperação de 100% do polissacarídeo em relação à etapa de precipitação com TCA 5%, portanto a recuperação final do processo foi de 50%.

Tabela 7 - Tabela do processo de purificação 6. Média e desvio padrão dos valores obtidos em 2 experimentos independentes.

Amostra	PS14 Total (mg)	Ac. Nucleico Total (mg)	Fator de Purificação por Etapa NA	Fator de Purificação Global NA	Proteína Total (mg)	Fator de Purificação por Etapa Prt	Fator de Purificação Global Prt
[50kDa] + Salina	177 ± 25	138 ± 2,7	1	1	379 ± 96	1	1
[50kDa] + SDS	101 ± 21	49 ± 18	1,7	1,7	356 ± 74	0,6	0,6
TCA 5%	87 ± 13	17 ± 8,2	3,1	4,5	30 ± 5,2	10	6,3
Sobren. EtOH 20%	89 ± 9,8	17 ± 9,8	1,1	4,9	18 ± 14	2,2	16
Solub. Ppt 60%	89 ± 11	1,4 ± 0,1	12	49	1,5 ± 0,5	11	140

A massa molecular média dos experimentos foi de 885 kDa e 869 kDa, ambas determinadas por CLAE-EM.

Figura 28 - Distribuição do tamanho do PS14 purificado no processo 6

Perfil determinado por cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular (CLAE-EM)

Assim, o uso da diafiltração com SDS seguida da precipitação com TCA 5% mostrou-se eficiente, alcançando os valores exigidos de pureza em relação aos contaminantes, embora a recuperação do polissacarídeo esteja um pouco baixa. Dessa forma, decidiu-se verificar a reprodutibilidade da sequência de operações desse mesmo processo de purificação com material de partida de um cultivo diferente.

5.6 Processo de purificação 7

O processo de purificação 7 também foi realizado em duplicata a partir do mesmo material de partida, neste caso de um cultivo em batelada com meio complexo.

Após a microfiltração, a amostra foi concentrada e diafiltrada em membrana de 50 kDa com SDS, assim como nos processos 4 a 6. A amostra diafiltrada seguiu para as etapas de precipitação com o ácido tricloroacético e etanol já estabelecidos. Ao final do processo, foi adicionada uma etapa de cromatografia de troca aniônica para garantir a pureza da amostra, levando-se em conta que o cultivo em batelada resultou em maior quantidade de contaminantes provenientes do conteúdo intracelular que o cultivo contínuo, devido à autólise que acontece com o pneumococo nessas condições (GOGOLA-KOLLING et al., 2014), e que o material de partida obtido com meio complexo apresentou maior teor de impurezas quando comparado com o meio definido, tal como mostra a comparação das quantidades de ácidos nucleicos e proteínas na fração inicial das Tabela 7 e Tabela 8. O solubilizado de 60% foi equilibrado com tampão adequado e submetido à adsorção em resina de Q-Sepharose. O PS14, por não possuir carga, não se ligou à resina e foi recuperado na fração não-adsorvida; já os ácidos nucleicos que têm carga negativa e algumas proteínas, também carregadas negativamente no pH empregado para aplicar a amostra, interagiram com o ligante da resina e ficaram adsorvidos a ela. A Figura 29, abaixo, mostra as etapas desse processo.

Figura 29 - Fluxograma das etapas do processo de purificação 7

50 kDa = membrana de ultrafiltração tangencial de 50 kDa; EtOH = etanol; TCA = ácido tricloroacético; Precip. = precipitação; Solub. Ppt = solubilização do precipitado com água destilada; CTA = cromatografia de troca aniônica

A Figura 30 compara a pureza e a recuperação do polissacarídeo nas etapas de purificação desse processo.

No microfiltrado, a pureza relativa foi próxima a zero em relação aos ácidos nucleicos e proteínas devido à grande quantidade desses contaminantes presentes na amostra. Quando o microfiltrado foi concentrado e diafiltrado com SDS, salina e tris, a recuperação do polissacarídeo foi de 83% e observou-se eliminação de 97% dos ácidos nucleicos, resultando no maior fator de purificação por etapa do processo (31) (Tabela 8), e 84% das proteínas.

Figura 30 - Recuperação global do PS14 e Pureza Relativa em relação aos ácidos nucleicos e proteínas ao longo das etapas do processo de purificação 7. Média e desvio padrão de 2 experimentos independentes.

O tracejado verde representa o limiar da pureza relativa requerida em relação aos ácidos nucleicos e o tracejado rosa representa o limiar da pureza relativa requerida em relação às proteínas

A precipitação do concentrado de 50 kDa com TCA 5% ofereceu baixo fator de purificação em relação às proteínas, resultando na pureza relativa de apenas 0,1, e elevou a pureza da amostra para 2,5 em relação aos ácidos nucleicos. A recuperação do PS14 dessa etapa em relação à etapa anterior foi de 89% e 74% em relação à primeira etapa do processo. Após a precipitação do sobrenadante da etapa anterior com 20% de etanol, 40% dos ácidos nucleicos foram eliminados e 91% das proteínas, com perda de 6% do polissacarídeo (Figura 30). A etapa de precipitação alcoólica a 60% eliminou 99% das proteínas em relação à etapa anterior com o fator de purificação de 53 (Tabela 8), sendo suficiente para alcançar a pureza relativa requerida (68), porém, a pureza em relação aos ácidos nucleicos não foi alcançada (18). Essa etapa resultou na recuperação de 66% do PS14 em relação à amostra inicial. A cromatografia de troca aniônica eliminou os restos de proteínas presentes na amostra, aumentando a pureza relativa para 154, e 92% de ácidos nucleicos, alcançando a pureza requerida (115). A recuperação do PS14 em relação à etapa anterior foi de 87% e 58% ao final do processo.

Tabela 8 - Tabela do processo de purificação 7. Média de 2 experimentos independentes.

Amostra	PS14 Total (mg)	Ac. Nucleico Total (mg)	Fator de Purificação por Etapa NA	Fator de Purificação Global NA	Proteína Total (mg)	Fator de Purificação por Etapa Prt	Fator de Purificação Global Prt
Microfiltrado 0,22 μm [50kDa] + SDS	356 $\pm$ 50	15647 $\pm$ 2213	1	1	20357 $\pm$ 2879	1	1
TCA 5%	297 $\pm$ 6	429 $\pm$ 111	31	31	3077 $\pm$ 137	5,5	5,5
Sobren. EtOH 20%	265 $\pm$ 43	105 $\pm$ 21	3,6	111	2255 $\pm$ 278	1,2	6,7
Solub. Ppt 60%	249 $\pm$ 60	62 $\pm$ 3	1,6	173	191 $\pm$ 24	10	73
CTA	235 $\pm$ 63	12 $\pm$ 1	4,6	796	3,4 $\pm$ 0,6	53	4018
	116 $\pm$ 43	1 $\pm$ 0	6,8	5190	0,7 $\pm$ 0,2	2,4	8679

A massa molecular média dos experimentos, determinada por CLAE-EM, foi 1089 e 1062 kDa (Figura 31).

Figura 31 - Distribuição do tamanho do PS14 purificado no processo 7

Perfil determinado por cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular (CLAE-EM)

Esse processo de purificação mostrou-se satisfatório e reprodutível quando feito com o mesmo material de partida, semelhante ao resultado obtido no processo de purificação 6, porém, uma etapa cromatográfica teve que ser adicionada para garantir a pureza do polissacarídeo. A recuperação final do PS14 em ambos os processos foi relativamente baixa, principalmente por perdas durante o uso da membrana na diafiltração (purificação 5), desse modo,

foi avaliado um novo processo de purificação empregando membrana de ultrafiltração de 30 kDa ou invés de 50 kDa para evitar as perdas do PS14 no ultrafiltrado durante a etapa de diafiltração.

5.7 Processo de purificação 8

O processo de purificação 8 empregou como material de partida a mesma amostra do cultivo contínuo utilizada no processo de purificação 6 e também foi feito em duplicada.

Após as etapas iniciais do processo de purificação, a amostra foi diafiltrada em membrana de ultrafiltração tangencial de 30 kDa com os mesmos tampões utilizados nas purificações passadas. O concentrado obtido seguiu para as etapas de precipitação com TCA 5%, 20% e 60% de etanol. Uma vez que a diminuição do tamanho dos poros das membranas evitou a perda de PS14, também dificultou a eliminação de contaminantes no ultrafiltrado, por isso, também foi necessário incluir uma etapa de cromatografia de troca aniônica no final do processo para alcançar a pureza requerida (Figura 32).

Figura 32 - Fluxograma das etapas do processo de purificação 8

30 kDa = membrana de ultrafiltração tangencial de 30 kDa; EtOH = etanol; TCA = precipitação com ácido tricloroacético; Precip. = precipitação; Solub. Ppt = solubilização do precipitado com água destilada. CTA = cromatografia de troca aniônica

No início do processo de purificação a pureza relativa foi de 1,5 para ácidos nucleicos e 0,3 para proteínas. Após a diafiltração com SDS em membrana de 30 kDa, 69% dos ácidos nucleicos foram eliminados, mas apenas 7% das proteínas. Como esperado, a recuperação do PS14 nessa etapa foi 85% (Figura 33), maior do que os valores de recuperação encontrados quando a concentração/diafiltração foi realizada com membrana de 50 kDa (média de 67%, purificações 4 a 7). Após a precipitação com TCA 5%, a pureza relativa para ácidos nucleicos foi de 8,9 e, apesar dessa etapa ter sido responsável por eliminar 51% de proteínas em relação à etapa anterior, a pureza relativa foi de apenas 0,6. A precipitação com 20% de etanol recuperou

77% do PS14, com a pureza relativa de 12 e 1,7 para ácidos nucleicos e proteínas, respectivamente (Figura 33).

Figura 33 – Recuperação global do PS14 e Pureza Relativa em relação aos ácidos nucleicos e proteínas ao longo das etapas do processo de purificação 8. Média e desvio padrão de 2 experimentos independentes.

O tracejado verde representa o limiar da pureza relativa requerida em relação aos ácidos nucleicos e o tracejado rosa representa o limiar da pureza relativa requerida em relação às proteínas

A etapa de precipitação com 60% de etanol eliminou 87% de ácidos nucleicos e 95% de proteínas, aumentando a pureza da amostra e resultando nos maiores valores de fator de purificação por etapa, 8 e 23 respectivamente, para ambos os contaminantes (Tabela 9). Nessa etapa, a pureza relativa para ácidos nucleicos e para proteínas já tinha sido alcançada (89 e 37, respectivamente), porém a pureza para proteínas estava muito próxima do limite exigido, sendo necessária mais uma etapa extra de purificação para garantir que a pureza fosse atingida independentemente das variações nos cultivos. Com a cromatografia de troca aniônica, foi eliminado quase 100% das proteínas em relação à etapa anterior, com pureza relativa de 146; para os

ácidos nucleicos a pureza relativa alcançou valores de 439. A recuperação final do polissacarídeo foi de 65%.

Tabela 9 - Tabela do processo de purificação 8. Média e desvio padrão de 2 experimentos independentes.

Amostra	PS14 Total (mg)	Ac. Nucleico Total (mg)	Fator de Purificação por Etapa NA	Fator de Purificação Global NA	Proteína Total (mg)	Fator de Purificação por Etapa Prt	Fator de Purificação Global Prt
[50kDa] + Salina	196 ± 26	131 ± 2,1	1	1	565 ± 137	1	1
[30kDa] + SDS	167 ± 10	41 ± 16	3,0	3,0	522 ± 101	0,9	0,9
TCA 5%	160 ± 17	18 ± 0,3	2,1	5,9	253 ± 30	1,9	1,8
Sobren. EtOH 20%	150 ± 26	13 ± 4,6	1,3	8,1	88 ± 7	2,6	4,8
Solub. Ppt 60%	147 ± 31	1,7 ± 0,4	8,0	58	4,1 ± 1,7	23	115
CTA	118 ± 18	0,3 ± 0,1	5,3	315	0,8 ± 0,6	4,7	611

A massa molecular média, determinada por CLAE-EM, foi de 895 kDa e 1005 kDa (Figura 34).

Figura 34 - Distribuição do tamanho do PS14 purificado no processo 8

Perfil determinado por cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular (CLAE-EM)

Foram utilizados dois modos de operação da etapa de cromatografia de troca aniônica no processo de purificação 8: o primeiro experimento foi feito em coluna HiTrap™ Q-Sepharose e o segundo utilizando a resina Q-Sepharose

para realização de cromatografia de adsorção em batelada. Os dois métodos eliminaram satisfatoriamente contaminantes presentes nas amostras e a recuperação por etapa do polissacarídeo foi aproximadamente a mesma.

Assim como observado nas purificações 6 e 7, esse processo também foi eficiente, alcançando a pureza requerida tanto para proteínas quanto ácidos nucleicos. A diminuição dos poros da membrana de concentração/diafiltração resultou em menores perdas de PS14, porém dificultou a eliminação dos contaminantes remanescentes no concentrado. A cromatografia de troca aniônica foi essencial para eliminar os restos de proteínas ainda presentes na amostra e aumentar a pureza do polissacarídeo, não havendo grandes perdas nessa etapa. Apesar de ter uma etapa a mais no processo de purificação, a recuperação do PS14 foi 15% maior quando comparada com o processo 6 e 7% maior quando comparada ao processo 7, o qual também incluiu uma etapa cromatográfica de troca aniônica.

Como o uso da membrana de poro menor durante as etapas de diafiltração com SDS teve resultados satisfatório e dentro do esperado, foi decidido avaliar a primeira etapa de concentração, logo após a microfiltração, com uma membrana de ultrafiltração tangencial com poros de 30 kDa e assim evitar as perdas do polissacarídeo, levando ao aumento da recuperação global do processo.

5.8 Processo de purificação 9

O processo de purificação 9 foi feito em duplicata a partir do mesmo material de partida, cultivo em batelada com meio complexo. Essa purificação foi constituída de microfiltração tangencial a 0,22 μ m, concentração e diafiltração com SDS em membrana de 30 kDa, única etapa que difere do processo anterior, precipitações com 5% de TCA e diferentes concentrações de etanol (20 e 60%) e cromatografia de troca aniônica (Figura 35).

Figura 35 - Fluxograma das etapas do processo de purificação 9

30 kDa = membrana de ultrafiltração tangencial de 30 kDa; EtOH = etanol; TCA = ácido tricloroacético; Precip. = precipitação; Solub. Ppt = solubilização do precipitado com água destilada; CTA = cromatografia de troca aniônica

Na amostra inicial (microfiltrado 0,22 μ m), a pureza relativa em relação aos ácidos nucleicos e proteínas era praticamente zero (Figura 36), igual aos valores encontrados na purificação 7 (Figura 30), em que o material de partida também era proveniente de cultivo em batelada com meio complexo. Nessa etapa de separação celular, aproximadamente 1% do polissacarídeo produzido no cultivo ficou retido junto com as células e foi eliminado.

Após a concentração e diafiltração com SDS em membrana de 30 kDa de corte nominal, foi eliminado 99% dos ácidos nucleicos presentes na amostra inicial, com o maior fator de purificação por etapa do processo (Tabela 10), e 92% das proteínas. Entretanto, a pureza relativa era de apenas 2,2 para ácidos nucleicos e de 0,2 para proteínas. Diferente do esperado para essa etapa da purificação, 45% do polissacarídeo foi eliminado no ultrafiltrado. A diminuição

dos poros da membrana e a prolongação do tempo de processamento da amostra nas etapas iniciais poderia ter causado hidrólise do polissacarídeo e o escape de partes pequenas pela membrana de ultrafiltração.

Figura 36 - Recuperação global do PS14 e Pureza Relativa em relação aos ácidos nucleicos e proteínas ao longo das etapas do processo de purificação 9. Média e desvio padrão de 2 experimentos independentes.

O tracejado verde representa o limiar da pureza relativa requerida em relação aos ácidos nucleicos e o tracejado rosa representa o limiar da pureza relativa requerida em relação às proteínas

A precipitação da amostra diafiltrada ([30 kDa] + SDS) com 5% de TCA resultou em perda de 7% do polissacarídeo em relação à etapa anterior e a pureza relativa ficou em 7,0 para ácidos nucleicos e 0,3 para proteínas (Figura 36). Depois das precipitações alcoólicas de 20% e 60%, a pureza relativa para ambos os contaminantes já tinha sido alcançada, entretanto muito próxima do limite requerido em relação às proteínas (38). Após as duas etapas de precipitação alcoólica, 90% do polissacarídeo foi recuperado em relação à etapa de TCA 5%, e 43% em relação à amostra inicial. A cromatografia de troca aniônica foi responsável por eliminar os restos de contaminantes ainda presentes na amostra, alcançando a pureza relativa de 217 para ácidos

nucleicos e 80 para proteínas. A perda de polissacarídeo nessa etapa foi de 2% e a recuperação final foi de 42%.

Tabela 10 - Tabela do processo de purificação 9. Média e desvio padrão de 2 experimentos independentes.

Amostra	PS14 Total (mg)	Ac. Nucleico Total (mg)	Fator de Purificação por Etapa NA	Fator de Purificação Global NA	Proteína Total (mg)	Fator de Purificação por Etapa Prt	Fator de Purificação Global Prt
Microfiltrado 0.22	1198±198	20037±0	1	1	43996±0	1	1
[30kDa] + SDS	664±50	150±1,7	74	74	4173±1563	6,4	6,4
TCA 5%	577±8,2	82±6,4	1,6	120	2167±533	1,6	10
Sobren. EtOH 20%	527±84	38±5,9	1,9	230	474±129	4,7	42
Solub. Ppt 60%	520±69	5,0±1,0	7,7	1779	12±1,4	39	1565
CTA	508±70	2,3 ±1,0	2,4	4009	6,3±2,8	2,2	3247

A massa molecular média foi das purificações foi de 561 kDa e 576 kDa (Figura 37). Apesar do tamanho acima do requerido pelos órgãos regulatórios, essa purificação apresentou massa molecular menor que todos os processos anteriores, corroborando a hipótese de que o maior tempo de processamento nas etapas iniciais provocou hidrólise de uma parte do PS, que foi eliminado no ultrafiltrado.

Figura 37 - Distribuição do tamanho do PS14 purificado no processo 9

Perfil determinado por cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular (CLAE-EM)

6 DISCUSSÃO

Os processos tradicionais de purificação do polissacarídeo capsular de *S. pneumoniae* do sorotipo 14 descritos na literatura apresentam algumas desvantagens para aplicação em larga escala, já que eles usam grande quantidade de fenol, reagente tóxico e corrosivo (INSTITUTE MERIEUX, 1980; YAVORDIOS; COUSIN, 1983). Dessa forma, este trabalho se propôs a desenvolver uma estratégia de purificação do PS14 diferente das descritas até agora, aproveitando-se da expertise do Laboratório de Bioprocessos para purificação de outros polissacarídeos capsulares (GONÇALVES et al., 2003, 2007; TAKAGI et al., 2008; TANIZAKI et al., 1996), tal como detalhado adiante.

As purificações foram realizadas a partir de diferentes materiais de partida e avaliadas quanto à recuperação do polissacarídeo e à sua pureza relativa em relação a proteínas e ácidos nucleicos, de forma a atingir o grau de pureza exigido pelos órgãos regulatórios. A Tabela 11 é um resumo dos resultados finais de todos os processos de purificação realizados nesse trabalho.

Tabela 11 - Resumo dos resultados finais de todos os processos realizados para purificação do polissacarídeo capsular de *S. pneumoniae* sorotipo 14.

Purificação nº	% Recuperação Global	PS14/AN final	PS14/Prt final	Tamanho molecular kDa	Nº de etapas
1a (Cetavlon)	55	54	21	V ₀ *	6
1b (TCA)	25	50	35	V ₀ *	6
2	40	57	44	V ₀ *	6
3	72	21	35	V ₀ *	4
4	60	50	145	1077	4
5	47	8,1	23	1008	4
6	50	63	59	877	5
7	58	115	154	1075	7
8	65	439	146	950	7
9	42	217	80	568	7

Em negrito os valores de pureza relativa que alcançaram os níveis exigidos.

* V₀ = volume de exclusão da coluna Sephacryl S-400.

Todos os processos de purificação tiveram como etapas iniciais a separação das células, por meio da microfiltração em membrana de 0,22 µm, diferenciando-se entre si nas etapas subsequentes (Figura 10). A concentração

do microfiltrado foi feita através de ultrafiltração tangencial com poros de 50 kDa ou 30 kDa de corte nominal. As precipitações alcoólicas foram realizadas com as concentrações de etanol que já estão bem estabelecidas na literatura (CANO; KUO; QUERRY, 1980; INSTITUTO MERIEUX, 1980; JUNG et al., 2011; MACHA, LAVANYA E NANNA, 2014; YAVORDIOS; COUSIN, 1983).

TCA foi avaliado para precipitar proteínas em diferentes posições dentro da sequência de etapas dos processos de purificação. Quando ele foi usado ao final do processo, ou seja, após as etapas de precipitação alcoólica, foi necessário incluir uma etapa adicional de precipitação com etanol para eliminar o TCA residual (purificação 2), o que resultou em baixa recuperação final do PS14 e, em alguns casos, a pureza requerida não foi alcançada, sendo necessário incluir ainda uma etapa de cromatografia de interação hidrofóbica (purificação 2). Assim, TCA foi avaliado para precipitar os contaminantes do concentrado de 50 kDa no início do processo. Neste caso, apesar de a pureza em relação aos ácidos nucleicos não ter sido alcançada (purificação 3), a recuperação do PS14 foi a maior dentre todos os processos de purificação realizados nesse trabalho.

O detergente aniônico SDS foi empregado durante a diafiltração do concentrado 50 kDa no início do processo de purificação. Vários experimentos foram feitos para estabelecer a ordem dos tampões usados na diafiltração e também a temperatura de precipitação e centrifugação, pois a 4 °C o SDS cristalizou e que isso dificultou as próximas etapas. Não houve aumento da recuperação de PS14 realizando as operações a 25 °C, mas isto facilitou as operações subsequentes. Apesar da eficiência desse processo para eliminar os contaminantes (purificações 4 e 5), a recuperação e pureza do polissacarídeo variou entre os lotes de fermentação distintos, ou seja, o emprego de SDS durante a diafiltração, seguido apenas das etapas de precipitação alcoólica, não foi capaz de absorver as diferenças de composição da matéria-prima.

Diante dos resultados obtidos, foi decidido incluir tanto a diafiltração com SDS como a precipitação por TCA em um mesmo processo de purificação. Este novo processo foi reprodutível quando adotado para purificar PS14 de material proveniente de cultivos contínuos realizados com meio de cultura definido (purificação 6). Entretanto, quando esse mesmo processo foi usado para purificar PS14 de cultivos em batelada feitos com meio de cultura

complexo (purificação 7), a pureza requerida não foi atingida para ácidos nucleicos, sendo necessário adicionar mais uma etapa de purificação ao processo. Desse modo, a cromatografia de troca aniônica foi avaliada e permitiu alcançar resultados satisfatórios de pureza e recuperação. Essa cromatografia foi escolhida por adsorver moléculas com carga negativa, nesse caso, os ácidos nucleicos e grande parte das proteínas (no pH utilizado), além de ser mais barata que a cromatografia de interação hidrofóbica e facilmente escalonável.

Tendo alcançado a pureza requerida por meio do processo composto das etapas: separação celular, concentração de 50 kDa, diafiltração em membrana de 50 kDa com SDS, precipitação por TCA e precipitação seletiva com etanol a 20% e 60% (purificação 6), uma outra modificação foi proposta a fim de aumentar a recuperação do polissacarídeo no final do processo de purificação, que se mantinha baixa principalmente pelas perdas durante a diafiltração. A diminuição dos poros das membranas utilizadas durante a etapa de diafiltração de 50 kDa para 30 kDa reduziu a perda de PS14, como o esperado, aumentando a recuperação desta etapa de 57% para 85%, mas também dificultou a eliminação posterior dos contaminantes, visto que a pureza relativa para proteínas e ácidos nucleicos ficou próxima do limite exigido após a precipitação com etanol 60% (Figura 33). Assim, a cromatografia de troca aniônica foi adicionada ao final do processo para garantir a eliminação dos contaminantes residuais ainda presentes. Apesar de uma etapa a mais, a purificação 8 teve a maior recuperação global de PS14 (65%), quando comparada aos processos de purificação que levaram à pureza requerida.

Finalmente, uma nova proposta de purificação foi avaliada baseada na purificação anterior. Os resultados nos mostraram (purificação 8) que a diminuição do poro da membrana seria eficiente na retenção do polissacarídeo e que o conjunto das etapas subsequentes eliminaria satisfatoriamente os contaminantes, alcançando a pureza requerida. Dessa forma, foi avaliado o uso da membrana de 30 kDa logo nas etapas iniciais (após a microfiltração) com amostra de cultivo em batelada com meio complexo (purificação 9). De fato, mesmo com maior quantidade de contaminantes nas primeiras etapas da purificação, resultado das condições do cultivo e do menor poro da membrana de ultrafiltração utilizada, a pureza requerida foi alcançada para ambos os

contaminantes no final do processo, entretanto a recuperação do polissacarídeo foi de apenas 42%, sendo que a maior perda foi durante a etapa de concentração e diafiltração com SDS, provavelmente pelo maior tempo de processamento.

Uma hipótese para a baixa recuperação encontrada no processo 9 está associada a uma das características dos cultivos descontínuos de pneumococo: a forte atividade lítica após a fase de crescimento que pode ser desencadeada por vários fatores, incluindo a produção de ácidos orgânicos e peptídeos específicos, entretanto não se sabe ao certo as condições exatas que desencadeiam o início do processo de autólise (GOGOLA-KOLLING et al., 2014). Apesar da elevada produção de PS nesse tipo de cultivo, a autólise pode ser desfavorável para a purificação do PS14. As autolisinas hidrolisam a camada peptidoglicana em sítios específicos entre o ácido N-acetilmurâmico e resíduos de alanina das pontes peptídicas (RONDA-LAIN et al., 1977; TOMASZ; WAKS, 1975), liberando o conteúdo intracelular e aumentando a concentração de contaminantes no meio. Além disso, a lise da parede celular libera diversas enzimas responsáveis por hidrolisar uma variedade de glicocompostos e liberar monômeros de açúcares que podem ser utilizados para o metabolismo do pneumococo.

O processo de hidrólise de moléculas glicosiladas está descrito durante a colonização das vias respiratórias humana, onde os açúcares livres se tornam escassos e a deglicosilação do muco fornece carbono e fonte de energia para o crescimento bacteriano (PAIXÃO et al., 2015). Apesar da grande diversidade dos glicoconjugados presentes na parede na nasofaringe, suas porções são compostas principalmente por galactose, N-acetilglucosamina e frutose. A partir da hidrólise da mucina por uma série de glicosidases, esses açúcares são liberados permitindo sua metabolização (PAIXÃO et al., 2015). Tettelin e colaboradores (2001) descrevem que as glicoproteínas e os polissacarídeos da mucina, bem como os próprios polissacarídeos capsulares, poderiam ser fontes de carbono para o metabolismo do pneumococo (TETTELIN et al., 2001).

Uma das glicosidases envolvidas na hidrólise dos glicoconjugados presentes na mucina é a β -N-acetilhexosaminidase (StrH), encontrada no pneumococo. Essa enzima é responsável por hidrolisar as ligações glicosídicas

da extremidade não redutora da β 1,2-N-acetilglucosamina (JIANG et al., 2011). Assim como a StrH, a β -Galactosidase (BgaA), está envolvida na hidrólise da ligação glicosídica (ZAHNER; HAKENBECK, 2000), removendo os resíduos terminais de galactose ligados na posição β 1,4 a um resíduo de glicose ou de N-acetilglucosamina (SINGH et al., 2014). Apesar de não termos encontrado artigos específicos relatando a hidrólise do PS14 por essas enzimas, o conjunto de informações confrontado com nossos resultados nos leva a crer que StrH e BgaA possam hidrolisar o PS da cápsula, que tem ligações β 1,6-N-acetilglucosamina e β 1,4-galactose, o que justificaria a menor massa molecular do PS encontrada na purificação 9. Do ponto de vista do processo, o uso de uma área filtrante maior poderia compensar a diminuição do poro da membrana de ultrafiltração sem aumentar o tempo dessa etapa e dessa forma evitar a hidrólise do PS.

A tabela abaixo (Tabela 12) mostra uma comparação das principais características dos processos de purificação de patentes e artigos e do processo desenvolvido neste trabalho.

Tabela 12 - Principais características dos processos de purificação analisados

Autor	Principais Características				Número de etapas	Recuperação (%)
Intitute Merieux	Lise com DOC	Fenol	Carvão Ativado	Ultracentrifugação	11	4%
Cano <i>et al.</i> ,	Lise com DOC	Cetavlon		Carvão Ativado	11	n.d.
Yuan <i>et al.</i> ,	Lise com DOC	Diminuição do pH		Carvão Ativado	7	55%
Suaréz <i>et al.</i> ,	Lise com DOC			Cromatografia de afinidade	9	2,3%
Macha <i>et al.</i> ,	Lise com DOC			Fosfato de Alumínio	10	81%
Este Trabalho	SDS	TCA		CTA	7	65%

n.d. – dado não disponível

O processo desenvolvido (purificação 8) tem como vantagem a purificação a partir do caldo de cultura livre de células, diferente dos processos descritos na literatura, que realizam a lise das células com DOC (CANO; KUO; QUERRY, 1980; INSTITUTE MERIEUX, 1980; JUNG et al., 2011; MACHA; LAVANYA; NANNA, 2014; SUÁREZ et al., 2001; YUAN et al., 2014). A etapa

de lise com detergente rompe as membranas das células liberando os contaminantes do meio intracelular, sendo necessária uma etapa extra apenas para retirar os debris celulares.

A microfiltração tangencial foi escolhida para separar as células do caldo fermentado contendo PS14 neste trabalho, pois impede a sedimentação das partículas devido ao fluxo tangencial constante, ela é comumente empregada em processos de purificação industrial pela capacidade de filtrar grandes volumes e de possibilitar o escalonamento, além de requerer investimento inicial menor do que uma centrífuga de fluxo contínuo (ANSEJO; PATRICK, 1990; CHERYAN, 1998). A etapa de ultrafiltração tangencial elimina os contaminantes que são menores que o poro da membrana escolhida, purificando e concentrando o produto de interesse e facilitando a diafiltração. Assim como a microfiltração, a ultrafiltração também requer baixo investimento inicial e alguns processos de purificação descrevem a substituição da ultracentrifugação, que chega a ser mais cara que a centrifugação contínua, pela ultrafiltração (GONÇALVES et al., 2003, 2007; TAKAGI et al., 2008; TANIZAKI et al., 1996;).

Tanizaki e colaboradores (1996) eliminaram completamente o uso de fenol substituindo-o por tratamento enzimático e ultrafiltração para a purificação do polissacarídeo capsular de *Neisseria meningitidis* do sorogrupo C. Esse processo também mostrou-se eficiente para purificação de polissacarídeos capsulares de outros microrganismos (GONÇALVES et al., 2003, 2007; TAKAGI et al., 2008). Entretanto, após o tratamento enzimático é necessário adicionar uma etapa para remoção dos materiais hidrolisados e das enzimas empregadas, o que pode ocasionar perdas do produto de interesse. Além disso, as agências regulatórias têm restringido o uso de enzimas de origem animal em produtos de uso humanos pelo risco de contaminação com príons (MACKAY; KRIZ, 2010), bem como aumentado as exigências para controle de qualidade de vacinas incluindo análises mais precisas e sensíveis, portanto também mais caras, para a detecção de materiais usados no processo de produção (SHIN et al., 2007).

Recentes trabalhos publicados tiveram a preocupação em substituir o uso do fenol bem como o tratamento enzimático para purificação de polissacarídeos de *S. pneumoniae*. Macha e colaboradores (2014)

descreveram a purificação baseada em precipitação com fosfato de alumínio e ultrafiltração tangencial, enquanto Yuan e colaboradores (2014) utilizaram filtração usando carvão ativado seguido de ultrafiltração tangencial.

No processo proposto nesse trabalho (purificação 8), parte das proteínas e ácidos nucleicos foi eliminada pelo uso de SDS na diafiltração e por precipitação com TCA no início do processo. As etapas de precipitação alcoólica subsequentes ajudaram a eliminar os restos SDS e TCA juntamente com os contaminantes ainda presentes na amostra, levando à obtenção do polissacarídeo puro.

Alguns detergentes são fracos e mantêm a estrutura biológica das membranas, proteínas e ácidos nucleicos, já os detergentes fortes rompem as membranas e desnaturam essas moléculas irreversivelmente, como é o caso do SDS e Cetavlon, usados em vários processos de purificação de polissacarídeos descritos na literatura. O SDS é um detergente aniônico capaz de romper as ligações não-covalentes e alterar a conformação nativa de algumas moléculas (APPLICHEM, 2008). No processo desenvolvido, após o uso do SDS durante a diafiltração foi eliminado 7% das proteínas e 68% dos ácidos nucleicos em relação à etapa anterior. Cano e colaboradores (1980) descreveram valores parecidos para eliminação de ácidos nucleicos, 69%, após o tratamento com Cetavlon, porém a eliminação de proteínas foi superior aos valores encontrados nesse trabalho, alcançando 55%. Entretanto, o método de purificação de Cano et al. (1980) consiste em 11 etapas, sendo 5 etapas de precipitação alcoólica, além de tratamento com carvão ativado e diálise, portanto é um processo bem mais complexo que o desenvolvido neste trabalho.

A maioria das proteínas pode ser precipitada a partir de soluções aquosas por adição de determinados ácidos, tais como TCA e ácido perclórico (SAEED; THOMASSEN, 1982). O TCA foi usado eliminando 51% das proteínas e adicionalmente 56% dos ácidos nucleicos, propriedade que até onde sabemos, ainda não estava descrita.

O método de purificação proposto por Suaréz e colaboradores (2001) é mais fácil e mais prático que os métodos tradicionais, pois elimina o uso de solventes e não emprega tratamento enzimático. Entretanto, a resina de afinidade por lectina de soja utilizada para adsorver o polissacarídeo tem baixa

capacidade (1,1 mg de PS por 1 mL de resina) e alto custo, dificultando o seu uso para a purificação em larga escala. Diferente do descrito por Suarèz et al. (2001), nosso processo utiliza cromatografia negativa, onde os contaminantes adsorvem na resina Q-Sepharose e o PS é recolhido na fração não-adsorvida. Essa resina possui alta capacidade (120 mg de albumina por 1 mL de resina) e menor custo, o que favorece seu uso em processos industriais.

Por fim, a recuperação do processo de purificação do PS14 foi de 65%, maior que a do método de purificação descrito por Yuan e colaboradores (2014), que recuperou aproximadamente 50%, porém menor do que o descrito por Macha et al. (2014), cuja recuperação foi de 81%. Tanto o processo estabelecido neste trabalho como o de Macha et al. (2014) baseiam-se em microfiltração, ultrafiltração e precipitações alcoólicas, porém Macha faz lise das células com DOC, precipitação com fosfato de alumínio e filtração em carvão ativado, enquanto que o processo deste trabalho utiliza precipitação com TCA e cromatografia de troca aniônica. Infelizmente, não foi possível comparar a recuperação do polissacarídeo e eliminação dos contaminantes em cada etapa do processo, já que Macha não mostrou a tabela completa de purificação, apresentando apenas os valores iniciais e finais. Macha, curiosamente, também enfatiza a importância de eliminar endotoxinas, entretanto, estas moléculas não fazem parte das membranas de bactérias Gram-positivas.

Desse modo, um novo processo de purificação para o sorotipo 14 foi desenvolvido. Este processo é composto pelas seguintes etapas: microfiltração tangencial, ultrafiltração tangencial em membrana de 50 kDa, diafiltração em membrana de 30 kDa em presença de SDS, precipitação com 5% de TCA e precipitações com 20% e 60% de etanol, e permitiu alcançar os níveis de pureza requerida pela OMS para proteínas e ácidos nucleicos, além de estar dentro das especificações de massa molecular.

7 CONCLUSÃO

Um novo processo de purificação do polissacarídeo capsular de *Streptococcus pneumoniae* do sorotipo 14 foi desenvolvido.

As etapas iniciais da purificação, constituídas de microfiltração e concentração em membrana de ultrafiltração tangencial em 50 kDa eliminaram grande quantidade de células e moléculas menores que o poro da membrana, e os contaminantes remanescentes na amostra foram retirados pelo conjunto de diafiltração com detergente SDS em membrana de 30 kDa, precipitações com ácidos e solventes, além de uma cromatografia de troca aniônica.

Esse processo foi constituído de 7 etapas e a recuperação final do polissacarídeo foi de 65%. Comparando com os processos já existentes ele apresenta vantagens em relação ao menor número de etapas e a recuperação está entre as maiores encontradas.

Esse processo é adequado para purificação do polissacarídeo capsular de *Streptococcus pneumoniae* sorotipo 14, escalonável e foi capaz de alcançar alto grau de pureza independente das variações de lote e de condições de cultivo, além do tamanho molecular dentro das especificações necessárias.

REFERÊNCIAS*

ALONSODEVELASCO, E.; VERHEUL, A. F. M.; VERHOEF, J.; SNIPPE, H. *Streptococcus pneumoniae*: Virulence Factors, Pathogenesis, and Vaccines. **Microbiological Reviews**. v. 59, n. 4, p. 591–603, 1995.

ANSEJO, J. A.; PATRICK, I. Large-scale protein purification. In: Harris, E.; ANGALS, S. (eds.) **Protein Purification Applications: A practical Approach**. Oxford: IRL Press, 1990, p.1-28

AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH. Protein Purification Handbook. GE, 1999

APPLICHEM. **Detergents**. Disponível em: <
<https://www.applichem.com/literatur/broschueren/detergents/> > Acesso em 05
jan 2015.

BERGMANN, S.; HAMMERSCHMIDT, S. Versatility of pneumococcal surface proteins. **Microbiology**, v. 152, n. 2, p. 295–303, 2006.

BOGAERT, D.; DE GROOT, R.; HERMANS, P. W. M. *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. **The Lancet Infectious diseases**, v. 4, n. 3, p. 144–54, 2004.

BRANDILEONE, M. C. C.; CASAGRANDE, S. T.; GUERRA, M. L. L. S.; ZANELLA, R. C.; ANDRADE, A. L. S. S.; FABIO, J. L.; Increase in numbers of β -lactam-resistant invasive *Streptococcus pneumoniae* in Brazil and the impact of conjugate vaccine coverage. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, n. 5, p. 567–574, 2006.

BRICKS, L. F.; BEREZIN, E. Impact of pneumococcal conjugate vaccine on the prevention of invasive pneumococcal diseases. **Jornal de Pediatria**, v. 82, n. 7, p. 67–74, 2006.

BUTLER, J. C.; BREIMAN, R. F.; CAMPBELL, J. F.; LIPMAN, H. B.; BROOME, C. V.; FACKLAM, R. R. Pneumococcal polysaccharide vaccine efficacy. An evaluation of current recommendations. **Journal of American Medical Association**, v. 270, N. 15, p. 1826-1831, 1993

CANO, F. J.; KUO, J. S. C.; QUERRY, M. V. **Purification of Pneumococcal Capsular Polysaccharides**. United State Patent # 4242501, 1980.

CHERYAN, M. **Ultrafiltration and microfiltration handbook**. Pennsylvania: Technomic Publsing, 1998.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.

DENG, S.; BAI, L.; REBOULET, R.; MATTHEW, R.; ENGLER, D. A.; TEYTON, L.; BENDELAC, A.; SAVAGE, P. B. A peptide-free, liposome-based oligosaccharide vaccine, adjuvanted with a natural killer T cell antigen, generates robust antibody responses in vivo. **Chemical science (Royal Society of Chemistry: 2010)**, v. 5, n. 4, p. 1437–1441, 2014.

DZIEZAK, J. D. Membrane separation technology offers processors unlimited potential. **Food technology**, v. 44, p. 108-113, 1990

FERREIRA, L. L. M.; CAEVALHO, E. S.; BEREZIN, E. N.; BRANDILEONE, M. C. Nasopharyngeal colonization and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* isolate from children with acute rhinopharyngitis. **Jornal de Pediatria**, v. 77, p. 227–234, 2001.

FIGUEIREDO, D. B.; CARVALHO, E.; KRASCHOWETZ, S.; ZANARDO, R. T.; SILVA, G. G.; CAMPANI, G.; ZANGIROLAMI, T. C.; CABRERA-CRESPO, J.; GONÇALVES, V. M. Desenvolvimento de processo de purificação da proteína a de superfície do pneumococo do clado. **Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química**. Editora Edgard Blücher, 2015. Disponível em: <<http://www.proceedings.blucher.com.br/article-details/16788>>. Acesso em: 17 jul. 2015

FRANCO, C. M.; ANDRADE, A. L.; AMDRADE, J. G.; ALMEIDA, E.; SILVA, S.; OLIVEIRA, C. R.; PIMENTA, F. C.; LAMARO-CARDOSO, J.; BRANDÃO, A. P.; ALMEIDA, S. C.; CALIX, J. J.; NAHM, M. H.; BRANDILEONE, M. C. Survey of nonsusceptible nasopharyngeal *Streptococcus pneumoniae* isolates in children attending day-care centers in Brazil. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 29, n. 1, p. 77–79, 2010.

FRASCH, C. E. Production and control of *Neisseria meningitidis* vaccines. In: MIZRAHI, A., ed. **Bacterial vaccines**. INC.: New York: Advances Biotechnology Process, 1990, v. 13, p. 123-145.

GARCÍA, E.; LLULL, D.; MUÑOZ, R.; MOLLERACH, M.; LÓPEZ, R. Current trends in capsular polysaccharide biosynthesis of *Streptococcus pneumoniae*. **Research in Microbiology**, v. 151, n. 6, p. 429–435, 2000.

GOGOLA, V. M. R.; CARMO, T. S.; GERALDO, C. S.; FIGUEIREDO, D. B.; GONÇALVES, V. M. Quantification of capsular polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* serotype 14 in culture broth samples. **Analalytical Biochemistry**, v. 421, p. 250-255, 2012.

GOGOLA-KOLLING, V. M. R.; ZANARDO, R. T.; CARMO, T. S.; ZAMPOLI, N. D.; FIGUEIREDO, D. B.; GONÇALVES, V. M. Improved capsular polysaccharide production by *Streptococcus pneumoniae* serotype 14 using

continuous cultivation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 91, p. 16–22, 2014.

GONÇALVES, V. M.; TAKAGI, M.; LIMA, R. B.; MASSALDI, H.; GIORDANO, R. C.; TANIZAKI, M. M. Purification of capsular polysaccharide from *Streptococcus pneumoniae* serotype 23F by a procedure suitable for scale-up. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 37, p. 283–287, 2003.

GONÇALVES, V. M.; TAKAGI, M.; CARMO, T. S.; LIMA, R. B.; ALBANI, S. M. F.; PINTO, J. V.; ZANGIROLAMI, T. C.; GIORDANO, R. C.; TANIZAKI, M. M.; CABRERA-CRESPO, J. Simple and efficient method of bacterial polysaccharides purification for vaccines production using hydrolytic enzymes and tangential flow ultrafiltration. **Applied Microbiology**, v. 1, p. 450–457, 2007.

HANAGE, W. P.; HUANG, S. S.; LIPSITCH, M.; BISHOP, C. J.; GODOY, D.; PELTON, S. I.; GOLDSTEIN, R.; HUOT, H.; FINKELSTEIN, J. A. Diversity and Antibiotic Resistance among Nonvaccine Serotypes of *Streptococcus pneumoniae* Carriage Isolates in the Post–Heptavalent Conjugate Vaccine Era. **Journal of Infectious Diseases**, v. 195, n. 3, p. 347–352, 2007.

HENRICHSEN, J. Six newly recognized types of *Streptococcus pneumoniae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 10, p. 2759–2762, 1995.

INSTITUT MÉRIEUX. **Procédé de purification de polysides de *Streptococcus pneumoniae* et vaccin à base de polysides ainsi purifiés.** France Patet #80 26320, 1980

JANSON, J.-C.; RYDÉN, L. **Protein purification: Principles, High Resolution Methods, and application.** Ed. Wiley-VCH, New York. Second Edition, 1998, p. 4-40.

JIANG, Y.-L.; YU, W.-L.; ZHANG J.-W.; FROLET, C.; GUILMI, A.-M. D.; ZHOU, C.-Z.; VERNET, T.; CHEN, Y. Structural basis for the substrate specificity of a novel β -N-acetylhexosaminidase StrH protein from *Streptococcus pneumoniae* R6. **Journal of biological chemistry**, v. 286, n. 50, p. 43004–43012, 2011.

JUNG, S.-J.; SEO, E.-S.; YUN, S.-H.; MINH, B.-N.; JIN, S.-D.; RYU, H.-J.; KIM, D. Purification of Capsular Polysaccharide Produced by *Streptococcus pneumoniae* Serotype 19A. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 7, p. 734–738, 2011.

KAMERLING, J. P. Pneumococcal polysaccharides: A chemical review. In: Tomasz, A (eds). ***Streptococcus pneumoniae: Molecular Biology and Mechanisms of Disease***. Mary Ann Liebert Publishers, New York, 2000, p. 81-114.

KADIOGLU, A.; WEISER, J. N.; PATON, J. C.; ANDREW, P. W. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 4, p. 288–301, 2008.

KOLKMAN, M. A. B.; WAKARCHUK, W.; NUIJTEN, P. J. M.; ZEIJST, B. A. M. Capsular polysaccharide synthesis in *Streptococcus pneumoniae* serotype 14: molecular analysis of the complete cps locus and identification of genes encoding glycosyltransferases required for the biosynthesis of the tetrasaccharide subunit. **Molecular Microbiology**, v. 26, p. 197–208, 1997.

KRASCHOWETZ, S.; FIGUEIREDO, D. B.; CAMPANI Jr. G.; SILVA, G. G.; ZANGIROLAMI, T. C.; LEITE, L. C. C.; CABRERA-CRESPO, J.; GONÇALVES, V. M. Produção de uma molécula recombinante híbrida de duas proteínas de *Streptococcus pneumoniae*: pspa94-pdt. **Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química**. Editora Edgard Blücher, 2015. Disponível em: <<http://www.proceedings.blucher.com.br/article-details/16847>>. Acesso em: 17 jul. 2015

LOWE, C. R.; LOWE, A. R.; GUPTA, G. New developments in affinity chromatography with potential application in the production of biopharmaceuticals. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 49, n. 1-3, p. 561–574, 2001.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; LEWIS, F.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, n. 193, p. 265–275, 1951.

MACHA, C.; LAVANYA, A.; NANNA, R. Purification of *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharides using aluminium phosphate and ethanol. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, p. 664–670, 2014.

MACKAY, D.; KRIZ, N. Current challenges in viral safety and extraneous agent testing. **Biologicals**, v. 38, n. 3, p. 335–337, 2010.

MANTESE, O. C.; PAULA, A.; MORAES, A. B.; MOREIRA, T. A.; GUERRA, M. L. L. S.; BRANDILEONE, M. C. C. Prevalence of serotypes and antimicrobial resistance of invasive strains of *Streptococcus pneumoniae*. **Jornal de Pediatria**, v. 79, n. 6, p. 537–542, 2003.

MORENO, A. T.; OLIVEIRA, M. L. S.; FERREIRA, D. M.; HOO, P. L.; DARRIEUX, M.; LEITE, L. C. C.; FERREIRA-Jr, J. M. C.; PIMENTA, F. C.; ANDRADE, A. L. S. S.; MIYAJI, E. N. Immunization of mice with single PspA fragments induces antibodies capable of mediating complement deposition on different pneumococcal strains and cross-protection. **Clinical and vaccine immunology**, v. 17, n. 3, p. 439–446, 2010.

MULDER, M. **Basic Principles of Membrane Technology**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, Second Edition, 1996.

MUÑOZ-ALMAGRO, C.; SELVA, L.; PALLARES, R. Influence of pneumococcal vaccine on the incidence of empyema. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, v. 16, n. 4, p. 394–8, 2010.

NATURE REVIEWS MICROBIOLOGY. Closing the Gapp on pneumonia. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 12, p. 838, 2009. Editorial

NELSON, A. L.; ROCHE, A. M.; GOULD, J. M.; CHIM, K.; RATNER, A. D.; WEISER, J. N. Capsule enhances pneumococcal colonization by limiting mucus-mediated clearance. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 1, p. 83–90, 2007.

NOVAES, H. M. D.; SARTORI, A. M. C. S.; SOÁREZ, P. C. DE. Hospitalization rates for pneumococcal disease in Brazil, 2004-2006. **Revista de Saúde Pública**, v. 45, n. 3, p. 539–547, 2011.

NUSSBAUM, R. L.; McINNES, R. R.; WILLARD, H. F. **Thompson & Thompson – Genética Médica**. Sétima Edição. Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, RJ, 2008.

O'BRIEN, K. L.; WOLFSON, L. J.; WATT, J. P.; HENKLE, E.; DELORIA-KNOLL, M.; McCALL, N.; LEE, E.; MULHOLLAND, K.; LEVINE, O. S.; CHERIAN, T. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. **Lancet**, v. 374, n. 9693, p. 893–902, 2009.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD - OPAS. **Informe Regional de SIREVA II**: Datos por país y por grupos de edad sobre las características de los aislamientos de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Neisseria meningitidis*, en procesos invasores. Documentos Técnicos: Tecnologías Esenciales de Salud, 2011.

OSELKA, G. Prevention of pneumococcal disease in Brazil. **Jornal de Pediatria**, v. 79, p. 195–196, 2003.

PAIXÃO, L.; OLIVEIRA, J.; VERISSIMO, A.; VINGA, S.; LOURENÇO, E. V.; VENTURA, M. R.; KJOS, M.; VEENING, J-W.; FERNANDES, V. E.; ANDREW, P. W.; YESILKAYA, H.; NEVES, A. R. Host glycan sugar-specific pathways in *Streptococcus pneumoniae*: galactose as a key sugar in colonisation and infection. **PloS one**, v. 10, n. 3, p. e0121042, jan. 2015.

PESSOA-JR, A.; KILIKIAN, B.V. **Purificação de biomoléculas**. Barueri, São Paulo: Manole, 2005.

REED, S. G.; BERTHOLET, S.; COLER, R. N.; FRIED, M. New horizons in adjuvants for vaccine development. **Trends in immunology**, v. 30, n. 1, p. 23–32, 2009.

REINERT, R.R. The antimicrobial resistance profile of *Streptococcus pneumoniae*. **Clinical microbiology and infection**, v. 15, p. 7–11, 2009.

RONDA-LAIN, C.; LOPEZ, R.; TAPIA, A.; TOMASZ, A. Role of the Pneumococcal Autolysin (Murein Hydrolase) in the Release of Progeny

Bacteriophage and in the Bacteriophage-Induced Lysis of the Host Cells. **Journal of Virology**, v. 21, n. 1, p. 366–374, 1977.

SAEED, K.; THOMASSEN, Y. Electrothermal atomic absorption spectrometric determination of selenium in blood serum and seminal fluid after protein precipitation with trichloroacetic acid. **Analytica Chimica Acta**, v. 143, n. 143, p. 223–228, 1982.

SCHLEIFER, K. H.; KRAUS, J.; DVORAK, C.; KILPPER-BÄLZ, R.; COLLINS M. D.; FISCHER, W. Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, Vol. 6, No. 2, 1985

STRATEGIC ADVISORY GROUP PF EXPERTS - SAGE. **Detailed Review Paper on Pneumococcal Conjugate Vaccine** - presented to the WHO Strategic Advisory Group of Experts (SAGE) on Immunization, p. 1–69, 2006.

SHIN, J.; WOOD, D.; ROBERTSON, J.; MINOR, P.; PEDEN, K. WHO informal consultation on the application of molecular methods to assure the quality, safety and efficacy of vaccines, Geneva, Switzerland. **Biologicals**, v. 35, n.1, p. 63-71, 2007.

SHKINEV, V. M.; FEDOROVA, O. M.; SPIVAKOV, B. Y.; MATTUSCH, J.; WENNRICH, R.; LOHSE, M. Speciation of metals associated with natural water components by on-line membrane fractionation combined with inductively coupled plasma atomic emission and mass spectrometries. **Analytica Chimica Acta**, n 327, p. 167-174, 1996.

SILVA, A. L. F. **Desenvolvimento de meio quimicamente definido para produção de polissacarídeo capsular em cultivo de *Streptococcus pneumoniae* sorotipo 14**. 2013. 109 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2013.

SINGH, A. K.; PLUVINAGE, B.; HIGGINS, M. A.; DALIA, A. B.; WOODIGA, S. A.; FLYNN, M.; LLOYD, A. R.; WEISER, J. N.; STUBBS, K. A.; BORASTON, A. B.; KING, S. J. Unravelling the multiple functions of the architecturally intricate *Streptococcus pneumoniae* β -galactosidase, BgaA. **PLoS pathogens**, v. 10, n. 9, 2014.

SINGLETON, R. J.; HENNESSY, T. W.; BULKOW, L. R.; HAMMITT, L. L.; ZULZ, T.; HURLBURT, D. A.; BUTLER, J. C.; RUDOLPH, K.; PARKINSON, A. Invasive pneumococcal disease caused by nonvaccine serotypes among alaska native pneumococcal conjugate vaccine coverage. **Journal of American Medical Association**, v. 297, n. 16, p. 1784–1792, 2007.

SOFER, G.; HAGEL, L. **Handbook of Process Chromatography: A guide and optimization, scale-up and validation**. London: Academic Press, 1997. 387 p.

SUÁREZ, N.; FRAGUAS, L.F.; TEXEIRA, E.; MASSALDI, H.; BATISTA-VIEIRA, F.; FERREIRA, F. Production of capsular polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* type 14 and its purification by affinity chromatography. **Application of Microbiology**, v. 67, n. 2, p. 969–971, 2001.

TAKAGI, M.; LIMA, R. B.; ALBANI, S. M. F.; ZANGIROLAMI, T. C.; TANIZAKI, M. M.; CABRERA-CRESPO, J. Purification of capsular polysaccharide produced by *Haemophilus influenzae* type b through a simple, efficient and suitable method for scale-up. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 35, n. 11, p. 1217–22, 2008.

TANIZAKI, M. M.; GARCIA, R.; RAMOS, J. B.; LEITE, L. C. C.; HISS, H.; FURUTA, J.; CABRERA-CRESPO, J.; RAW, I. Purification of meningococcal group C polysaccharide by a procedure suitable for scale-up. **Journal of Microbiological Methods**, v. 27, n. 96, p. 19–23, 1996.

TETTELIN, H.; NELSON, K. E.; PAULSEN, I. T.; EISEN, J. A.; READ, T. D.; PETERSON, A.; HEIDELBERG, J.; DeBOY, R. T.; HAFT, D. H.; DODSON, R. J.; DURKIN, A. S.; GWINN, M.; KOLONAY, J.F.; NELSON, W. C.; PETERSON, J. D.; UYAM, L. A.; WHITE, O.; SALZBERG, S. L.; LEWIS, M. R.; RADUNE, D.; HOLTZAPPLE, E.; KHOURI, H.; WOLF, A. M.; UTTERBACK, T. R.; HANSEN, C. L.; McDONALD, L. A.; FELDBLYUM, T. V.; ANGIOULI, S.; DICKINSON, T.; HICKEY, E. K.; HOLT, I. E.; LOFTUS, B. J.; YANG, F.; SMITH, H. O.; VENTER, J. C.; DOUGHERTY, B. A.; MORRISON, D. A.; HOLLINGSHEAD, S. K.; FRASER, C. M. Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*. **Science**, v. 293, n. 5529, p. 498–506, 2001.

TOMASZ, A.; WAKS, S. Mechanism of action of penicillin: Triggering of the pneumococcal autolytic enzyme by inhibitors of cell wall synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 72, n. 10, p. 4162–4166, 1975.

VIEIRA, A. C.; GOMES, M. C.; FILHO, M. R.; FILHO, J. E.; BELLO, E. J.; FIGUEIREDO, R. B. *Streptococcus pneumoniae*: a study of strains isolated from cerebrospinal fluid. **Jornal de Pediatria**, v. 83, n. 1, p. 71–78, 2007.

WARD, O. P. **Fermentation Biotechnology**: Principles, Process and Products. England: John Wiley & Sons, 1989. 227 p.

WARD, O. P. Recovery of Cell Products. In: - (ed). **Bioprocessing**. Van Nostrand Reinhold, New York (USA), 1991. 137-149 p.

WATANABE, E. O.; FILHO, P. A. P.; MIRANDA, E.A; MOHAMED, R. S. Evaluation of the use of volatile electrolyte system produced by ammonia and carbon dioxide in water for the salting-out of proteins: Precipitation of porcine trypsin. **Biochemical Engineering Journal**, v. 30, n. 2, p. 124–129, 2006.

WATSON, D. A.; MUSHER, D. M.; JACOBSON, J. W.; VERHOEF, J. A Brief History of the Pneumococcus in Biomedical Research : A Panoply of Scientific Discovery. **Clinical Infectious Diseases**, v. 17, n. 5, p. 913–924, 2010.

WEINBERGER, D. M.; TRZCINSKI, K.; LU, Y-J.; BOGAERT, D.; BRANDES, A.; GALAGAN, J.; ANDERSON, P. W.; MALLEY, R.; LIPSITCH, M. Pneumococcal capsular polysaccharide structure predicts serotype prevalence. **PLoS pathogens**, v. 5, n. 6, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Recommendations for the production and control of pneumococcal conjugate vaccines. **World Health Organ. Tech. Rep. Ser.**, n. 927, Annex 2, p. 64-98, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Who position paper on pneumococcal vaccines**, v. 87, n. 14, p. 129–144, 2012.

YAVORDIOS, D.; COUSIN, M. **Procédé d'obtention de polyosides capsulaires, polyosides capsulaires ainsi obtenus et leur application à la préparation de vaccins**. France Patent # 0071515 A1, 1983.

YOSHIOKA, C. R. M.; MARTINEZ, M. B.; BRANDILEONE, M. C. C.; RAGAZZI, S. B.; GUERRA, M. L. L. S.; SANTOS, S. R.; SHIEH, H. H.; GILIO, A. E. Analysis of invasive pneumonia-causing strains of *Streptococcus pneumoniae*: serotypes and antimicrobial susceptibility. **Jornal de Pediatria**, v. 87, n. 1, p. 70–75, 2011.

YOTHER, J.; BENTLEY, S. D.; HENNESSEY, J. P. Jr. Genetics, Biosynthesis and Chemistry of Pneumococcal Capsular Polysaccharides. In: SIBER, G. R.; KLUGMAN, K. P.; MAKELA, P. H. **Pneumococcal Vaccines**. Washington, EUA: ASM Press, 2008, p. 33-46

YUAN, Y.; RUPPEN, M.; SUN, W-Q.; CHU, L.; SIMPSON, J.; PATCH, J.; MORAN, J.K.; CHARBONNEAU, P.F. **Shortened Purification process for the production of capsular Streptococcus pneumoniae polysaccharide**. United States Patent #US 2014/0363463 A1, 2014.

ZAHNER, D.; HAKENBECK, R. The *Streptococcus pneumoniae* Beta-Galactosidase Is a Surface Protein. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 20, p. 5919–5921, 2000.