SILVIA MARIA FERREIRA ALBANI

Métodos alternativos de purificação do polissacarídeo capsular de *Haemophilus influenzae* tipo b

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

Orientador: Dr. Joaquin Cabrera-Crespo

São Paulo
2008

RESUMO

ALBANI, S.M.F. **Métodos alternativos de purificação do polissacarídeo capsular de *Haemophilus influenzae* tipo b**. 2008. 95 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2008.

Haemophilus influenzae tipo b (Hib) é uma bactéria patogênica responsável por causar meningites, pneumonia, principalmente em crianças menores de cinco anos. A cápsula polissacarídica (PSb) é o principal fator de virulência, a qual é purificada e conjugada à proteína, e usada como vacina contra Hib. O processo clássico de purificação do PSb envolve várias etapas de precipitação com etanol e detergente catiônico (inflamável e poluente), extração com fenol (tóxico e corrosivo) e etapas de centrifugação/ultracentrifugação. O objetivo deste estudo foi melhorar o processo de purificação do PSb, substituindo total ou parcialmente o uso de etanol e/ou de centrífugas durante a purificação através de cromatografia, de digestão enzimática acoplada a sistemas de membrana de microfiltração (MFT) e/ou ultrafiltração tangencial (UFT). O sobrenadante proveniente do cultivo fermentado e após a separação celular foi concentrado e diafiltrado em membrana de ultrafiltração tangencial de 100 kDa (UFT100). A fração concentrada foi submetida a diferentes etapas de purificação. As cromatografias de troca iônica não deram boas separações entre PSb e os contaminantes. A cromatografia de filtração em gel tem apresentado separação, mas o volume de amostra é pequeno e o fluxo muito baixo. A hidrofóbica em pH mais neutro poderia ser uma opção para eliminar as proteínas, mas não os ácidos nucleicos. As precipitações com etanol parecem ser necessárias de alguma forma para obter a pureza requerida. De algum modo o etanol facilitou a ação enzimática desnaturando proteínas e/ou ácidos nucleicos, desestabilizando prováveis agregados e auxiliando na posterior etapa de ultrafiltração. A separação dos 30% de etanol por microfiltração tangencial de 0,22 µm em fibras-ocas novas mostrou excelentes valores de purificação em comparação a etapa de centrifugação, entretanto testes de envelhecimento acelerado usando células de Hib reduziu a eficiência da membrana.

Palavras-chave: *Haemophilus influenzae* tipo b; Polissacarídeo capsular; Processos de purificação; Microfiltração tangencial; Ultrafiltração tangencial; Cromatografia.

ABSTRACT

ALBANI, S.M.F. **Alternative methods for purification of capsular polysaccharide produced by *Haemophilus influenzae* type b.** 2008. 95 f. Master thesis (Biotechnology) Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2008.

Haemophilus influenzae type b (Hib) is a pathogenic bacterium responsible for meningitis, pneumonia in children aged less than 5 years. The capsular polysaccharide (PSb) is the most important virulence factor and currently it is purified, conjugated to a protein and used as vaccine against Hib. The classical PSb purification process is very complex, which include many ethanol and cationic detergent precipitations (explosion prone and pollutant), phenol extraction (toxic and corrosive) and centrifugation/ultracentrifugation steps. The aim of this work was to improve the process of purification of PSb by total or partial replacement of ethanol precipitations and/or elimination of centrifugation by chromatographies, enzymatic digestion and tangential ultrafiltration (TUF100 kDa) or microfiltration (0.22 μm) membranes. After cell separation, the clarified supernatant was concentrated and diafiltrated by TUF100kDa membrane. The concentrated fraction was submitted to different steps of purification. The ion exchange chromatographies did not give good separation between PSb and contaminants. The resolution in gel filtration was better, but sample volume must be small and flow rate low. Hydrophobic chromatography at neutral pH can be used for elimination of proteins but not for nucleic acids. Ethanol precipitations at 30 and 80% are necessary to achieve the required purity of polysaccharide in respect to proteins and nucleic acid contaminants. In some way, ethanol facilitated the action of hydrolytic enzymes by denaturation of proteins/nucleic acids or make instable some aggregates and improve further ultrafiltration step. The separation of 30% ethanol fraction using new microfiltration membrane hollow fiber 0.22 μm exhibited a better purification than centrifugation, however test of accelerate aging, with the use of whole cell has reduced its efficiency.

Keywords: *Haemophilus influenzae* type b; Capsular polysaccharide; Purification process; Tangential microfiltration; Tangential ultrafiltration; Chromatography.

1 INTRODUÇÃO

1.1 O microrganismo

Os *Haemophilus influenzae* são bactérias Gram-negativas, aeróbicas/microaerofílicas, apresentam morfologia coco bacilar, são imóveis, não esporulados, estando presente na nasofaringe de 75% das crianças e adultos saudáveis, constituindo, portanto, carregadores assintomáticos. Não há registro de detecção deste microrganismo em nenhuma outra espécie animal (ADA e ISAACS, 2003; KELLY et al., 2004). Foi isolado em 1890 por Pfeiffer durante uma pandemia de gripe, sendo confundido como causador da gripe. Provavelmente, *H. influenzae* foi um importante invasor secundário ao vírus da gripe (*influenza*) na pandemia de 1890 e em muitas outras que se seguiram (PITTMAN, 1931).

Por serem organismos fastidiosos, o gênero *Haemophilus* (“amigos do sangue”) requer precursores de heme para crescimento, que estão presentes no sangue, especificamente o fator X (i.e., hemin) e o fator V (NAD ou NADP) (HARRISON et al., 2008). Esta bactéria cresce melhor entre 35 e 37 °C, com pH ótimo em torno de 7,6. Em laboratório, cresce em condições aeróbicas, com baixa tensão de CO₂ (5% CO₂), embora seja capaz de fazer a via glicolítica e a cadeia respiratória usando o nitrato como acceptor final de elétrons.

Em 1995, o *H. influenzae* foi o primeiro organismo a ter o genoma inteiramente sequenciado, sendo que as informações genéticas geradas evidenciaram características importantes sobre os fatores de virulência e os alvos vacinais, bem como conhecimentos sobre as diferentes rotas metabólicas desse microrganismo (ALI et al., 2002).

1.2 Patogenicidade

Uma fração dos portadores assintomáticos, que corresponde de 3 a 7%, pode albergar variantes patogênicas de *Haemophilus influenzae*, sendo de grande importância na transmissão da bactéria. Crianças menores de cinco anos, idosos e indivíduos imunodeprimidos são os mais afetados por esta infecção, que inclui meningite, pneumonia, epiglote, septicemia, etc. (KELLY et al., 2004).

Esta espécie bacteriana pode apresentar uma estrutura externa, denominada cápsula. Dependendo da composição do polissacarídeo que a compõe, é classificada em seis sorotipos diferentes (a, b, c, d, e, f). As não capsuladas são classificadas como não tipável (KELLY et

Haemophilus influenzae infections

Figura 2 - Infecções causadas pelo sorotipo b e por linhagens não-tipáveis de *H. influenzae*.

FONTE: <<http://www.textbookofbacteriology.net/haemophilus.html>>

O *H. influenzae* não produz exotoxinas conhecidas. O papel direto da endotoxina na meningite ou na bacteremia não está esclarecido, embora lipopolissacarídeos da membrana externa das bactérias Gram-negativas atuem na inflamação associada aos quadros de otite média. Todas as linhagens virulentas produzem neuraminidase e uma IgA protease, mas a ação dessas enzimas extracelulares na invasão é pouco provável. A presença de fimbria aumenta a aderência da bactéria às células da mucosa humana e é fundamental para a colonização da nasofaringe. O antígeno de Anton, presente nas hemácias, parece ser o receptor para essa fimbria (GILSDORF et al., 1992; VAN HAM et al., 1995).

1.3 Epidemiologia e o impacto das vacinas contra Hib

A maneira efetiva de prevenir as doenças causadas por *H. influenzae* tipo b, principalmente entre crianças menores de cinco anos, é através dos programas de vacinação pública, os quais foram implantados no Brasil em 1999 (KMETZSCH et al., 2003). Tal estratégia gerou impactos positivos, diminuindo a incidência e a mortalidade (MIRANZI et al., 2006). Nos últimos anos, conforme mostra a **Figura 3**, em São Paulo, a taxa de incidência de meningite por *H. influenzae* tipo b em menores de cinco anos de idade declinou de 12,8 para 0,7 por 100.000 habitantes, após a inclusão da vacina no calendário oficial do Estado, observando-se redução de mais de 90% na incidência da doença (CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2004).

Figura 3 - Sequência cronológica, de 1990 a 2004, da incidência e da letalidade das meningites por *Haemophilus influenzae* tipo b em menores de cinco anos de idade no Estado de São Paulo.

FONTE: Centro de Vigilância Epidemiológica, 2004.

Conforme publicação da *Public Library of Science Medicine* (PLOS Medicine), até o final de 2006 todos os países das Américas, com exceção do Haiti, tinham incluído a vacina contra Hib no calendário de imunização infantil, resultando na cobertura vacinal de 98% dos 16 milhões de nascidos anualmente. Antes da introdução da vacina, era estimada a ocorrência de 20.000 casos anuais de meningites por Hib nas Américas, o que significava a incidência de 35 casos por 100.000 crianças de até quatro anos de idade (DANOVARO-HOLLIDAY et al., 2008).

O uso de vacinas constituídas pela cápsula bacteriana é capaz apenas de induzir forte resposta primária de anticorpos, mas com pequena indução de memória imunológica. Para contornar essa característica indesejável, surgiram as vacinas conjugadas, nas quais o PSb de Hib é conjugado quimicamente a uma proteína de escolha para modificar o tipo de apresentação do antígeno e o tipo de resposta imune induzida, garantindo, assim, resposta de memória imunológica do tipo T-dependente, que é eficiente na faixa etária de maior risco (KELLY et al., 2004). Os diferentes tipos de vacinas conjugadas licenciadas estão citados na **Tabela 1**.

Tabela 1 - Vacinas conjugadas de Hib licenciadas.

Vacina	Fabricante	*PRP	ligante conjugação	Proteína carregadora
PRP-D	ProHIBiT (Connaught)	Médio	Carbono-6	Toxóide Diftérico
HbOC	HibTITER (Wyeth-Lederle)	Pequeno	Nenhum	Toxina mutada CRM197 de <i>Corynebacterium diphtheriae</i>
PRP-OMP	PedvaxHIB (Merck)	Médio	Thioether	Complexo protéico da Membrana externa de <i>Neisseria meningitidis</i>
PRP-T	ActHIB (Sanofi Pasteur) OmniHIB (GlaxoSmithKline)	Grande	Carbono-6	Toxóide Tetânico

FONTE: Adaptado de <<http://www.textbookofbacteriology.net/haemophilus.html>>

*PRP- poliribosil ribitol fosfato (polissacarídeo capsular)

Apesar das vacinas conjugadas já serem produzidas e comercializadas, o interesse nacional em melhorar as condições de produção e de purificação desses compostos microbianos continua, pois essas vacinas são muito caras e o país necessita de autonomia para a elaboração de tão importante agente imunizante.

A produção de vacinas é compreendida por distintos processos, como o cultivo do microorganismo em biorreatores, denominado de produção e posterior inativação do mesmo; seguido da purificação. No caso particular das vacinas conjugadas, a etapa final corresponde ao processo de conjugação acompanhado de segunda purificação.

1.4 Produção e purificação do polissacarídeo vacinal

A produção de um determinado bioproduto, em larga escala, é realizada em biorreatores que possuem sistemas informatizados capazes de controlar a aeração, a agitação, o pH, a temperatura; além de bombas para adição de nutrientes, ácido, álcali, etc (WARD, 1989; WARD, 1991; PACE, 1987; TAKAGI et al., 2003; TAKAGI et al., 2008).

No caso particular de Hib, o aumento da produção de polissacarídeo foi verificado em meio de cultura contendo casaminoácidos-extrato de levedura, como peptona de soja-extrato de levedura (MP). O meio MP aumentou a produção de PSb para 258 mg/L, valor superior quando comparado com o meio BHI (*Brain Heart Infusion*), que atingiu 91 mg/L de polissacarídeo (CARTY et al., 1985). Anderson (1977) obteve o melhor resultado com o meio de casaminoácido-extrato de levedura tamponado com fosfato de potássio 0,1 M em pH 7,5, atingindo 182 mg/L de polissacarídeo. O cultivo em batelada alimentada, com a cepa Eagan e meio contendo casaminoácido-extrato de levedura para a produção do polissacarídeo capsular de *H. influenzae* b, foi descrito por Merrit et al. (2000), obtendo-se concentração de polissacarídeo de 1.200 mg/L, bem superior ao processo em batelada no qual conseguiu-se o valor de 490 mg/L e também àqueles descritos em todas as patentes.

Recentemente, Takagi e colaboradores (2006) estudaram os efeitos da aeração superficial e submersa, da concentração de oxigênio dissolvido controlada a 10 e 30% da saturação de ar, e a interferência do controle de pH no crescimento celular e na produção de polissacarídeo. No estudo, utilizou-se meio de cultura contendo peptona de soja e extrato de levedura como meio complexos. Nestas condições, verificou-se que, utilizando aeração superficial, obtiveram-se 421 mg PSb/L, enquanto que sob aeração submersa, a 10 e 30% da saturação de ar sem controle de pH, foram alcançados 550 mg PSb/L. Porém, a introdução do controle de pH foi o grande diferencial, gerando 950 mg PSb/L. A manutenção da concentração de oxigênio dissolvido a 10 ou a 30% da saturação de ar não resultou em diferenças significativas na formação de polissacarídeo. Cultivos realizados em batelada alimentada, com a mesma cepa e meio de cultura, com controle de pH e aeração submersa a 30% de saturação de ar, utilizando meio de alimentação contendo glicose-extrato de levedura na relação (C:N) de 2:1, apresentaram valor de polissacarídeo final de 2.000 mg PSb/L (TAKAGI et al., 2007).

Segundo Takagi et al. (2006), a melhora na produtividade de PSb deve-se a três importantes mudanças no protocolo de cultivo, que depende da composição do meio, da aeração e do controle do pH a 7,2. Após vários estudos, observou-se que a produção de PSb

não está relacionada diretamente com o oxigênio dissolvido, já o pH pode, sim, influenciar, afetando a rota metabólica, ocasionando mudanças na composição e no tamanho do PSb, tendo em vista que o mesmo está sobre o controle de vários genes (TAKAGI et al., 2006).

A síntese de PSb é um dos fatores limitantes na produção das vacinas polissacarídicas, que está na ordem de 0,25-2 g/L de cultivo. Diferentemente das proteínas, ela é dependente de vários genes e, na maioria dos casos, sua rota metabólica ainda não é facilmente manipulável (BENTLEY et al., 2006; TAKAGI, 2003).

Após a finalização do cultivo, a etapa seguinte corresponde à purificação (*downstream process*), na qual o produto “bruto” é processado até se obter o grau de pureza requerido para seu uso, buscando maximizar sua recuperação e minimizar o custo (WARD, 1991; KASTNER e GOLKER, 1987).

A purificação envolve uma série de passos independentes, na qual se utiliza das diferentes propriedades físico-químicas do produto de interesse e dos contaminantes, para que, de forma progressiva, ocorra o enriquecimento da fração de interesse e a eliminação dos componentes indesejados. A etapa de purificação se baseia nas diferentes propriedades das moléculas, como solubilidade, hidrofobicidade, carga elétrica, tamanho molecular, propriedades especiais (termo-resistência), afinidade por outras moléculas; além da localização celular (intra ou extracelular) (WARD, 1989; WARD, 1991; SOFER e HAGEL, 1997; ANSEJO e PATRICK, 1990).

Além de buscar atingir a pureza relativa, os produtos biotecnológicos devem cumprir normas e exigências em relação à quantidade residual permitida de impurezas, como ácidos nucléicos e substâncias pirogênicas, limites relativos à “cor”, ausência de atividades enzimáticas nocivas ao produto e que possam comprometer o uso (ex: proteases, atividade hemolítica). As normas a serem cumpridas são das agências reguladoras, como a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), a FDA (*Food and Drug Administration*), a OMS (Organização Mundial da Saúde) ou pelas farmacopéias. O complexo processo de purificação desses produtos representa de 20 a 80% do custo total (SCOPES, 1994; ERSSON et al., 1998; SOFER e HAGEL, 1997).

O método tradicional de purificação de polissacarídeo é caracterizado por várias etapas de precipitação com etanol, extração por solventes orgânicos, como o fenol, e etapas de centrifugação/ultracentrifugação. Entretanto, o uso do etanol implica no emprego de uma centrífuga contínua em altas velocidades e maiores tempos, uma vez que o *pellet* muitas vezes não apresenta característica consistente. Além disso, o espaço físico deve ser apropriado, com instalações à prova de explosão, e cuidados de manipulação, o que demanda custo e tempo.

Quanto ao emprego do fenol, este se apresenta extremamente tóxico e corrosivo, exigindo prudência em seu manuseio (**Figura 4**) (GOTSCHLICH et al., 1969; FRASCH, 1990; KUO, 1980; INSTITUT MERIEUX, 1980; YAVORDIOS e COUSIN, 1983; HILLEMANN et al., 1984; LEE et al., 1994).

No processo de purificação, desenvolvido 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; GONÇALVES et al., 2007) e de *H. influenzae* tipo b (TAKAGI et al., 2008), as inúmeras precipitações com etanol no método tradicional foram reduzidas a apenas duas, as centrifugações foram reduzidas para o total de três e o uso do fenol foi eliminado completamente. O emprego do fenol foi substituído por tratamentos enzimáticos, com endonuclease e proteases, seguido de ultrafiltração tangencial de corte molecular de 100 kDa, capaz de remover oligonucleotídeos e peptídeos menores que 100 kDa. Ao final do processo adicionou-se detergente DOC e EDTA, responsáveis por quebrar as regiões hidrofóbicas dos lipopolissacarídeos, auxiliando na sua remoção. Desse modo, o fluxograma para purificação de PSb ficou reduzido (**Figura 5**) (TAKAGI et al., 2008).

Figura 4 - Fluxograma do processo tradicional de purificação do polissacarídeo de *H. influenzae* b. À esquerda do fluxograma, em vermelho, encontram-se os descartes do processo e à direita, em azul, o subproduto recuperado.

Figura 5 - Fluxograma do processo alternativo de purificação de polissacarídeo de *H. influenzae* tipo b. À esquerda do fluxograma, em vermelho, encontram-se os descartes do processo e à direita, em azul, os subprodutos recuperados.

O tratamento da amostra de PSb com enzimas hidrolíticas e concentrações/diafiltrações em membranas de corte molecular de 100 kDa, na presença de detergente DOC e EDTA, eliminou as impurezas residuais das proteínas, dos ácidos nucleicos e dos LPS (TANIZAKI et al., 1996; TAKAGI et al., 2008).

Dentre os contaminantes que devem ser eliminados durante o processo de purificação, citados por Takagi e colaboradores (2003), destacam-se as proteínas, os ácidos nucleicos e os lipopolissacarídeos (LPS).

As proteínas apresentam cargas elétricas tanto positivas como negativas, regiões hidrofóbicas e hidrofílicas, regiões resistentes ao atrito e às nucleases e são hidrolisadas por proteases. Já os ácidos nucleicos possuem carga elétrica negativa, devido ao grupo fosfato presente na molécula, e regiões hidrofóbicas que, em geral, em condições fisiológicas, não estão expostas e são resistentes às proteases e sensíveis ao atrito e às nucleases. Quanto aos lipopolissacarídeos, outro contaminante a ser eliminado, também conhecidos como endotoxinas, que se localizam na membrana externa das bactérias Gram-negativas (**Figura 6**), apresentam cargas elétricas negativas, devido a presença de grupo fosfato na porção do lipídeo A, são hidrofóbicos (presença de ácidos graxos na região do lipídeo A), suas subunidades formam micelas resultantes de interações não-polares entre as cadeias lipídicas e os grupos fosfato, caracterizando elevada massa molecular. A presença de LPS é preocupante (em formulação vacinal) por se tratar de substância pirogênica (MAGALHÃES et al., 2007; BROCK, 1991). As características apresentadas pelas biomoléculas contaminantes dificultam o desenho de um método de purificação otimizado, representando grande desafio durante o projeto.

Figura 6 - Esquema da parede celular de organismos Gram-negativos e estrutura química do lipopolissacarídeo indicando as três regiões características deste monômero.

FONTE: <<http://www.unb.br/ib/cel/microbiologia/morfologia1/pcgneg.gif>>, MAGALHÃES et al., 2007.

1.5 Principais técnicas de purificação

Abaixo, segue a descrição dos principais processos de purificação utilizados neste trabalho.

1.5.1 Precipitação

A precipitação consiste na alteração da solubilidade de um ou mais componentes da solução, envolvendo o uso de solventes orgânicos e de sais, a alteração do pH, o aumento ou a diminuição de temperatura. A maioria dos precipitados forma um produto não-cristalino, constituído de várias espécies de moléculas e que pode ser removido por centrifugação e/ou filtração (WARD, 1989; WARD, 1991; PACE, 1987; ANSEJO e PATRICK, 1990; PRAZERES e FERREIRA, 2004).

1.5.2 Centrifugação

A centrifugação baseia-se na separação de partículas em suspensão de acordo com as diferentes massas ou densidades, através de um campo gravitacional centrífugo, acelerando o processo de sedimentação, sendo um recurso muito utilizado desde as fases iniciais da purificação, separando as células bacterianas do meio líquido (PESSOA-JR e KILIKIAN, 2005; ROUSH e LU, 2008). Usualmente é empregada quando outro procedimento, como a microfiltração, não esteja disponível ou não seja adequado.

A velocidade de sedimentação das partículas depende do seu respectivo diâmetro, da diferença de densidade da partícula e do meio líquido no qual se encontra, assim como a viscosidade do meio e o campo centrífugo decorrente da rotação angular. Para ilustrar, segue a equação 1 referente ao fluxo em L/h de uma centrífuga:

$$Q = \frac{d^2 \times (\rho_{\text{sólido}} - \rho_{\text{solvente}}) g \Sigma}{18\eta} \quad (\text{eq.1})$$

$$\Sigma = Z \times F \quad (\text{eq.2})$$

$$Z = \frac{Rn^2}{900} \quad (\text{eq.3})$$

onde: Q = vazão (litros/hora); d = diâmetro da partícula (cm); ρ = densidade (g/cm^3); g = constante gravitacional (cm/s^2); η = viscosidade (g/cm-s); F = volume retido na centrífuga

(litros); Z = coeficiente de centrifugação; R = diâmetro do rotor (cm); n = velocidade do rotor (rpm) (HARRISON et al., 2003).

As velocidades de sedimentação se diferenciam na dependência do diâmetro apresentado pelas partículas. Portanto, várias técnicas são utilizadas, visando aumentar o tamanho das partículas suspensas, como o ajuste de pH e a adição de eletrólitos na suspensão, aumentando, assim, a velocidade de sedimentação (PESSOA-JR e KILIKIAN, 2005).

1.5.3 Filtração

A filtração separa materiais de diferentes tamanhos, por meio de uma barreira sólida, denominada filtro ou membrana, restringindo total ou parcialmente o transporte de uma ou várias moléculas presentes. As moléculas que atravessam o filtro são denominadas de filtrado ou clarificado; aquelas que são retidas pelo filtro constituem o retido, o concentrado, o precipitado ou a “torta” (CHERYAN, 1998).

Abaixo, segue a equação que descreve o processo de filtração:

$$V = \frac{k\Delta P}{\mu(R_{membrana} + R_{torta})} \quad (\text{eq.4})$$

Onde: V = velocidade superficial do líquido (m/h); k = permeabilidade da membrana (m^2); ΔP = diferença de pressão entre os dois lados da membrana (N/m^2); $(R_{membrana} + R_{torta})$ = resistência da membrana mais resistência da torta (m/kg); μ = viscosidade do líquido (kg/m.h).

Portanto, num sistema de filtração, a velocidade é proporcional à pressão, sendo a pressão inversamente proporcional à viscosidade e à resistência da membrana e da torta.

Alguns aspectos importantes, como porosidade, espessura, permeabilidade e seletividade, devem ser levados em consideração na escolha do filtro adequado a ser utilizado num processo (CHERYAN, 1998). Esses processos apresentam como vantagens: o baixo custo operacional, a possibilidade de manipulação em temperatura ambiente e serem multi-propósitos (CHERYAN, 1998; CHARCOSSET, 2006).

Basicamente, a filtração pode ser classificada em convencional (*Dead-End* ou *End-to-End*) e tangencial. Na filtração convencional o fluxo principal e o fluxo de filtrado estão na mesma direção e atravessam o filtro, depositando sobre o mesmo uma camada (ou torta). A

filtração convencional apresenta um fluxo diretamente proporcional à pressão e à área, com tortas incompressíveis, ex: cristais, caolin e certos minérios. Os produtos biológicos são compressíveis, os produtos insolúveis ou com tamanho grande depositam-se sobre o filtro e vão se compactando, aumentando, assim, a resistência e diminuindo o fluxo de filtrado (**Figura 7**). Tal procedimento é muito utilizado para a esterilização de meios de cultivo (CHARCOSSET, 2006; REIS e ZYDNEY, 2007).

A filtração tangencial é mais efetiva, pois dificulta a sedimentação de partículas na superfície do filtro, devido ao fluxo tangencial constante (**Figura 7**). O fluxo principal e o fluxo do filtrado possuem orientações diferentes. O fluxo principal corre tangente ao filtro e o fluxo do filtrado atravessa a membrana (WARD, 1989; WARD, 1991; ANSEJO e PATRICK, 1990; CHERYAN, 1998; SPECTRUM LABORATORIES, 2008). Neste caso, a pressão hidráulica contribui para acelerar o processo de transporte, juntamente com a natureza da membrana, que seleciona os componentes a serem permeados ou retidos, uma vez que apresentam massas molares diferentes (CHERYAN, 1998). Esse tipo de membrana é muito comum em processos de purificação industrial, para concentrar o produto de interesse, ou até mesmo para remover tampões e/ou solventes (CHARCOSSET, 2006).

As membranas vêm sendo amplamente utilizadas em bioprocessos, principalmente no tratamento de material lábil, pois oferecem grande flexibilidade de uso. Os diferentes tipos de membranas podem ser classificados a partir do tamanho dos solutos a serem separados. Filtros de microporos (microfiltração) possuem tamanhos dos poros discretos, variando entre 0,1 e 0,6 micrômetros de diâmetro. São convencionalmente usados na clarificação do bioproduto, separando sólidos de líquidos (substâncias solúveis de insolúveis), constituindo pré-filtros. (WARD, 1991; CHERYAN, 1998). Na microbiologia, a microfiltração tangencial vem sendo utilizada para separar células do meio fermentado (WARD, 1991; ROUSH e LU, 2008; CHERYAN, 1998; REIS e ZYDNEY, 2007) pela capacidade de filtrar grandes volumes e de possibilitar o escalonamento.

Figura 7 - Esquema ilustrativo dos tipos de filtração: tangencial (à esquerda) e convencional (*Dead-End*).

FONTE: SPECTRUM LABORATORIES, 2008.

As membranas de ultrafiltração, com poros muito menores do que as membranas de microporos permitem a separação por tamanhos moleculares. Possibilitam a passagem de moléculas solúveis com massas molares variando de 1.000 a 1.000.000 Daltons (WARD, 1991; CHERYAN, 1998). Esta técnica vem sendo amplamente utilizada nas indústrias desde 1970, facilitando a operação na remoção de água e/ou solventes nas etapas de concentração e troca de tampões. Ao mesmo tempo, pode constituir, por si só, uma etapa de purificação que elimina contaminantes com tamanhos inferiores ao poro (oligossacarídeos, peptídeos e oligonucleotídeos). Embora o tamanho molecular seja o principal fator de separação envolvido, a forma e a carga elétrica também podem determinar o fluxo pela membrana (WARD, 1991; PACE, 1987).

O maior obstáculo encontrado na filtração deve-se à formação de *fouling* (gel, torta), que resulta na redução do fluxo permeado com o passar do tempo. Tal fenômeno é alcançado rapidamente na filtração convencional, enquanto que na filtração tangencial a formação desta camada é mais lenta. Tal fato deve-se à incrustação de componentes presentes na solução de trabalho na membrana, que podem ficar adsorvidos tanto na superfície como no interior dos poros da membrana, através de interações físico-químicas ou até mesmo pela obstrução mecânica dos poros, gerando acúmulo de partículas e/ou cristalização e precipitação de pequenos solutos na superfície ou nos poros da membrana, considerados total ou parcialmente irreversíveis. Já a polarização da membrana resulta da seletividade do processo, aumentando a concentração de macrossolutos próximo à superfície da membrana, produzindo alta pressão

osmótica e gerando mais resistência frente à filtração; porém, é considerada reversível, ou seja, por meio de fluxo reverso e/ou limpeza, a permeabilidade pode ser readquirida (PESSOA-JR e KILIKIAN, 2005; CHERYAN, 1998; HANISCH, 1986).

1.5.4 Cromatografia

A cromatografia fundamenta-se na separação de solutos de uma solução, a partir da diferença de migração, obtida pela interação dos solutos em um sistema de fase fixa (resina) e móvel (gás ou líquido) (GANETOS e BARKER, 1991).

Alguns componentes presentes na fase móvel podem ficar adsorvidos reversivelmente na resina (através de ligações não covalentes, como troca iônica, hidrofóbica, afinidade), dependendo das características dos solutos, assim como da própria resina. Já na cromatografia de filtração em gel ou exclusão molecular, os diferentes componentes migram com velocidades distintas, dependendo do tamanho, e não ocorre a adsorção dos solutos (COLLINS et al., 1995).

O monitoramento da cromatografia pode ser feito através de medições em tempo real da absorção a 280 nm ou em outro comprimento de onda, do pH e da condutividade. Também podem ser usados detectores de índice de refração, fluorimetria e outros. Estes dados podem ser registrados em gráficos e cromatogramas ou armazenados em programas de computador para posterior análise (SCOPES, 1994; ERSSON et al., 1998; SOFER e HAGEL, 1997; ANSEJO e PATRICK, 1990).

Existem parâmetros que caracterizam a cromatografia independentemente do tipo de separação: a seletividade (que implica na capacidade de diferenciar duas substâncias, através da distância entre os picos no cromatograma); a eficiência (que descreve a largura dos picos, ou seja, se os picos e as bases estão separados); a capacidade (que implica na quantidade de amostra que se pode aplicar sem perder seletividade e eficiência) e a resolução (que relaciona a qualidade de separação de uma proteína em relação às demais), através da análise dos picos, incluindo a largura e a distância entre eles (COLLINS et al., 1995).

Na cromatografia de troca iônica, a fase estacionária contém trocadores de cargas opostas às moléculas que ficam adsorvidas reversivelmente na matriz. É possível encontrar trocadores aniônicos, carregados positivamente, e também os catiônicos carregados negativamente (GANETOS e BARKER, 1991). Os trocadores aniônicos ou catiônicos fortes são carregados eletricamente em qualquer pH, como, por exemplo: o amônio quaternário (Q^+) e sulfo propil (SP^-). Os trocadores fracos estão carregados eletricamente em uma faixa de duas

a três unidades acima ou abaixo de pH 7 como, por exemplo: dietilaminoetil (DEAE⁺) e carboxy metil (CM⁻). A matriz da resina que contém o grupo trocador pode ser de celulose, agarose ou dextrana (COLLINS et al., 1995).

As propriedades apresentadas pelas biomoléculas, como a carga elétrica, são dependentes do pH e consideradas na realização da cromatografia de troca iônica (SCOPES, 1994). As proteínas apresentam, em geral, cargas elétricas positivas e negativas, com predomínio de uma ou de outra, dependendo do pH do meio e do seu ponto isoelétrico (pI). Os ácidos nucleicos, polissacarídeos e lipopolissacarídeos são carregados negativamente e apresentam-se ionizados em grande faixa de pH (14~4); somente em meios muito ácidos perdem a carga elétrica (PRAZERES e FERREIRA, 2004; DIOGO et al., 2005; FERREIRA et al., 2000; COLLINS et al., 1995). As cromatografias de troca-iônica são usadas na purificação de populações diferentes de polissacarídeos e de diferentes densidades de carga (HABIBI et al., 2005).

Uma das propriedades importantes apresentadas pelos trocadores está relacionada com a capacidade, ou seja, a quantidade de produto que adsorve por mL de resina. Essa capacidade depende de muitos fatores, dentre eles a força iônica, o pH, o tamanho do produto, o fluxo de aplicação e a temperatura do eluente (COLLINS et al., 1995; DIOGO et al., 2005). As cromatografias de troca iônica iniciam-se em baixa concentração de íons (força iônica baixa) e, geralmente, em pH 6~8; já a eluição das moléculas é realizada por incrementos de concentração de íons e/ou trocas de pH.

Na cromatografia hidrofóbica ocorre interação entre um radical hidrofóbico, como fenil, butil ou octil, presente na fase fixa, com as moléculas (ou parte delas) que sejam hidrofóbicas. As resinas que contêm os grupos hidrofóbicos podem ser de celulose, agarose ou dextrana. A interação hidrofóbica fica realçada quanto maior for a concentração de sais e a alta força iônica, neutralizando as cargas das regiões ionizadas, expondo as regiões hidrofóbicas das moléculas para o ligante da resina (GANETOS e BARKER, 1991). A adsorção é realizada em alta força iônica e a eluição em baixa concentração de íons e/ou alterando o pH e/ou a temperatura e/ou uso de solventes orgânicos (GANETOS e BARKER, 1991).

Em geral, os polissacarídeos e os ácidos nucleicos (em condições fisiológicas) são hidrofílicos e não adsorvem nestas resinas. Os lipopolissacarídeos (LPS) e as bases púricas e pirimidínicas dos ácidos nucleicos (AN) apresentam regiões hidrofóbicas, uma vez que as bases nitrogenadas dos AN, quando expostas a um dano mecânico ou álcali, expõem a região hidrofóbica da molécula. Já as proteínas (Prt) apresentam regiões tanto hidrofóbicas quanto

hidrofílicas em sua estrutura e geralmente sua hidrofobicidade em solução aquosa se concentra na região mais interna da proteína, enquanto os resíduos polares ou carregados situam-se na parte mais externa. Sendo assim, uma maneira de ressaltar esta hidrofobicidade seria apresentando íons (*salting-out*) que diminuíssem a solubilidade protéica, aumentando o nível de entropia na região de moléculas de água que envolvem grupos hidrofóbicos (PRAZERES e FERREIRA, 2004; FERREIRA et al., 2000; PESSOA JR e KILIKIAN, 2005).

Através da cromatografia de gel filtração, as biomoléculas são separadas de acordo com suas respectivas massas molares, uma vez que a fase estacionária, composta de polímeros, possui porosidade definida. O único inconveniente deste tipo de cromatografia é o fluxo baixo, o que exige maior tempo de separação (WARD, 1991; PESSOA JR e KILIKIAN, 2005).

1.5.5 Hidrólise enzimática

A hidrólise com enzimas apresenta uma série de características atrativas para auxiliar no processo de purificação, principalmente devido ao alto grau de especificidade com o substrato sem afetar o produto. As enzimas podem ser de origem vegetal, animal, bacteriana ou fúngicas, sendo que a maior parte das usadas comercialmente é microbiana (WARD, 1991).

Em bioprocessos, uma das dificuldades encontradas para remover os contaminantes indesejáveis deve-se à viscosidade, característica apresentada pelos ácidos nucleicos e também pelos componentes da parede celular. Enzimas, como as nucleases que degradam os ácidos nucleicos ou a lisozima que hidrolisam a parede celular, possuem papel crucial, reduzindo a viscosidade, melhorando a separação de células ou particulados sobrenadantes nas centrifugações, auxiliando na filtração de soluções, principalmente na ultrafiltração, melhorando, assim, a recuperação dos produtos de interesse.

6 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos é possível concluir que o uso de centrífugas para separar as células de *H. influenzae* tipo b mostrou-se mais eficiente em relação à microfiltração, que apresentou perdas significativas do PSb conforme a maior frequência de usos das membranas.

A etapa de concentração e diafiltração em membrana de corte molecular de 100 kDa é necessária para reduzir o volume de trabalho e, ao mesmo tempo, eliminar impurezas menores de 100 kDa.

As cromatografias de troca iônica não mostraram boas separações entre o PSb e os contaminantes, no entanto a cromatografia hidrofóbica com pH neutro poderia ser uma opção na etapa intermediária de purificação para eliminar principalmente as proteínas. Embora a resolução da filtração em gel não ter mostrado uma resolução satisfatória, apresentou uma boa pureza relativa para ambos os contaminantes (proteínas e ácidos nucleicos).

O uso de tratamento enzimático, com remoção contínua dos hidrolisados em membrana de 5 kDa, com a finalidade de aumentar a eficiência enzimática, removendo os possíveis inibidores enzimáticos, não é viável por ser um processo muito demorado.

A utilização da membrana de ultrafiltração tangencial de 300 kDa acarretou em grandes perdas de PSb, além de não atingir a pureza requerida.

O uso de etanol mostrou-se realmente necessário para atingirmos a pureza requerida do processo. A combinação de ultrafiltração tangencial em membrana de 100 kDa, etanol, enzimas hidrolíticas, detergentes e quelante possibilitou atingir a pureza relativa requerida, sendo esta maior que 100, tanto para proteínas como para ácidos nucleicos.

Apesar das membranas de microfiltração serem muito eficiente quanto a remoção de componentes insolúveis da precipitação com 30% de etanol, esta apresenta tempo de uso muito limitado principalmente quando se utiliza célula como material de partida ao invés de sobrenadante. Uma alternativa é realizar a precipitação após a digestão com enzimas hidrolíticas, ainda que o etanol favoreça a digestão enzimática de alguma maneira, de tal forma que contenha carga de contaminantes menor e permita extensão da vida-útil desta membrana.

Em síntese pode-se dizer que a maior contribuição deste trabalho foi evidenciar a possibilidade de implantar o uso de membranas de fibra-oca nas etapas de precipitação por etanol ao invés de centrífugas, tornando o processo mais simples e prático de ser executado. Além disso, a introdução da ultrafiltração tangencial para reduzir o volume do clarificado de 30% de etanol e

conseqüentemente reduzir em até 15 vezes o volume de etanol a 80% acrescentado, contribui na redução do custo operacional de maneira segura assim como na restrição do impacto ambiental.

REFERÊNCIAS¹

- ADA, G.; ISAACS, D. Carbohydrate-protein conjugate vaccines. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 9, p. 79-85, 2003.
- ALI, T. R.; KROLL, S.; LANGFORD, P. R. *Haemophilus influenzae* microarrays: virulence and vaccines. **Comp. Funct. Genom**, v. 3, p. 358-361, 2002.
- ANDERSON, P; SMITH, D. H. Isolation of the capsular polysaccharide from culture supernatant of *Haemophilus influenzae* type b. **Infect. Immun.**, v. 15, n. 2, p. 472-477, 1977.
- ANDERSON, P. W.; PICHICHERO, M. E.; STEIN, E. C.; PORCELLI, S.; BETTS, R. F.; CONNUCK, D. M.; KORONES, D.; INSEL, R. A.; ZAHRADNICK, J. M.; EBY, R. Effect of oligosaccharide chain length, exposed terminal groups, and hapten loading the antibody response of human adults and infants to vaccines consisting of *Haemophilus influenzae* type b capsular antigen uniterminally coupled to the diptheria protein CRM₁₉₇. **J. Immunol.**, v. 142, p. 2464, 1989.
- ANSEJO, J. A.; PATRICK, I. Large- scale protein purification. In: Harris, E.; ANGALS, S. **Protein Purification Applications: A practical Approach**. Oxford: IRL Press, 1990. p. 1-28.
- ASHWELL, G. Colorimetric analysis of sugar. **Methods Enzymol.**, v. 3, p. 87-90, 1957.
- BALAN, J. C. **Estudo da interação de derivados aquo- soluveis de celulose com tensoativos catiônicos**. 67 f. Dissertação (Mestrado em Derivados de Celulose, Tensoativos Catiônicos e Fluorescência) - Faculdade de Filosofia, Ciências e letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.
- BENTLEY, S. D.; Aanensen, D. M.; Mavroidi, A.; Saunders, D.; Rabbinoiwitsch, E.; Collins, M.; Donohoe, K.; Harris, D.; Murphy, L.; Quail, M. A.; Samuel, G.; Skovsted, I. C.; Kaltoft, M. S.; Barrell, B.; Reeves, P. R.; Parkhill, J.; Spratt, B. G. Genetic Analysis of the Capsular Biosynthetic Locus from All 90 Pneumococcal Serotypes. **PLoS Genetics**, v. 2, p. 262-269, 2006.

¹ De acordo com:

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

BROCK, T. D.; MADIGAN, M. T. **Biology of Microorganisms**. 6 ed. New Jersey: Prentice Hall, 1991.

CARTY, C. E.; MANCINELLI, R.; HAGOPIAN, A.; KOVACH, F. X.; RODRIGUEZ, E.; BURKE, P.; DUNN, N. R.; MCALEER, W. L.; MAIGETTER, R. Z.; KNISKERN, P.. Fermentation Studies with *Haemophilus influenzae*. **Dev. Ind. Microbiol.**, v. 26, p. 763-767, 1985.

CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. **Prevenção da doença meningocócica e estratégia de controle CVE documentos técnicos**. Disponível em: <www.cve.saude.sp.gov.br>. Acesso em: 10 set. 2006.

CHARCOSSET, C. Membrane processes in biotechnology: An overview. **Biotechnol. Adv.**, v. 24, p. 482-492, 2006.

CHENA, Y.; CHENB, Y. S.; GUA, G. Influence of pretreating activated sludge with acid and surfactant prior to conventional conditioning on filtration dewatering. **Chem. Eng. J.**, v. 99, p. 137-143, 2004.

CHEN, Y.; CHEN, Y.; CHEN, J.; YANG, H. Kinetics of PHB-containing biomass disruption in surfactant chelate aqueous solution. **Process Biochem.**, v. 38, p. 1173-1182, 2003.

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

CHU, H. P.; LI, XIAU-yan. Membrane fouling in a membrane bioreactor(MBR): sludge cake formation and fouling characteristics. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 90, n. 3, p. 323-331, 2004.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a métodos cromatográficos**. Campinas. UNICAMP. 1995.

CRISEL, R. M.; BAKER, R. S.; DORMAN, D. E. Capsular polymer of *Haemophilus influenzae* type b. I. Structural characterization of the capsular polymer of strain Eagan. **J. Biol. Chem.**, v. 250, p. 4926-4930, 1975.

DANOVARO-HOLLIDAY, M. C.; GARCIA, S.; QUADROS, C de; TAMBINI, G.; ANDRUS, J. K. Progress in vaccination against *Haemophilus influenzae* type b in the Américas. **PLoS Med.**, v. 5, n. 4, p. 530-536, 2008.

DIOGO, M. M.; QUEIROZ, J. A.; PRAZERES, D. M. F. Review Chromatography of plasmid DNA. **J. Chromatogr.**, v. 1069, p. 3-22, 2005.

DRURY, H. Identification and estimation of pentoses in the presence of glucose, **Arch. Biochem.**, v. 19, p. 455-466, 1948.

EON-DUVAL, A.; MACDUFF, R. H.; FISHER, C. A.; et al. Removal of RNA impurities by tangential flow filtration in an RNase-free plasmid DNA purification process. **Anal. Biochem.**, v. 316, n. 1, p. 66-73, 2003.

ERSSON, B.; RYDEN L.; JANSON J. C. Introduction to Protein Purification. In: **Protein Purification: Principles, High Resolution Methods, and Applications**. New York: Wiley-VCH, 1998. p. 3-40.

FERREIRA, G. N. M. et al. Downstream processing of plasmid DNA for gene therapy and DNA vaccine applications. **Trends Biotechnol.**, v. 18, p. 380-388, 2000.

FRASCH, C. E. Production and control of *Neisseria meningitides* vaccines. In: MIZRAHI, A (Ed.). **Bacterial Vaccines**. New York: Advances Biotechnology Processes, 1990. v. 13, p. 123-145.

GANETOS, G.; BARKER, P. E. Large- scale chromatography in industrial processing. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, v. 50, p. 101-108, 1991.

GILSDORF, J. R.; CHANG, H. Y.; McCREA, K. W.; BAKALETZ, L. O. Comparison of hemagglutinating pilli of *Haemophilus influenzae* type b with similar structures of nontypeable *H. influenzae*. **Infect. Immun.**, v. 60, n. 2, p. 374-379, 1992.

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. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, 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. L. 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. In: MENDEZ-VILAS, A. (Ed.). **Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology**. Sevilha: Formatex, 2007. v. 1, p. 450-457.

GOTSCHLICH, E. C.; LIU T.Y.; ARTENSTEIN, M. S. Human immunity to the meningococcus. 3. Preparation and immunochemical properties of the group A, group B, and group C meningococcal polysaccharides. **J. Exp. Med.**, v. 129, n. 6, p. 1349-1365, 1969.

HARRISON, L. H.; SIMONSEN, V.; WALDMAN, E. A. Emergence and disappearance of a virulent clone of *Haemophilus influenzae* biogroup aegyptius, cause of brazilian purpuric fever. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 21, n. 4, p. 594-605, 2008.

HARRISON, R. G.; TODD, P. W.; RUDGE, S. R.; PETRIDES, D. Sedimentation. In: _____. **Bioseparations Science and Engineering**. New York: Oxford University Press, 2003. p. 142-167.

HABIBI, Y.; MAHROUZ, M. E.; VIGNON, M. R. Arabian-rich polysaccharides isolated and characterized from the endosperm of the seed of *Opuntia ficus-indica* prickly pear fruits. **Carbohydr. Polym.**, v. 60, p. 319- 329, 2005.

HANISCH, W. Cell Harvesting. In: MCGREGOR, W. C. (Ed.). **Membrane Separations in biotechnology 1**. New York: Dekker, 1986. p. 61-87.

HARSCOAT, C.; JAFFRIN, M. Y.; BOUZERAR, R.; COURTOIS, J. Influence of fermentation conditions and microfiltration processes on membrane fouling during recovery of glucuronane polysaccharides from fermentation broths. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 65, n. 5, p. 500-511, 1999.

HILLEMAN, M. R.; TAI, J. Y.; TOLMAN, R. L.; VELLA, P. P. **Coupled *Haemophilus influenzae* type b vaccine**. Euro. Patent 0.117.783 A2, 1984.

INSTITUT MERIEUX. **Procédé de purification de polyosides de *Streptococcus pneumoniae* et vaccin à base de polyosides ainsi purifiés**. Brevet Belge 8.026.320, 1980.

KASTNER, G. S.; GOLKER, C. F. Downstream Processing in Biotechnology. In: BULOCK, J.; KRISTIANSEN, B. **Basic Biotechnology**. London: Academic Press, 1987. p. 173-193.

KELLY, D. F.; MOXON, E. R.; POLLARD, A. J. *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines. **Immunology**, v. 113, p. 163–174, 2004.

KENNETH TODAR UNIVERSITY OF WISCONSIN-MADISON. Disponível em: <<http://textbookofbacteriology.net/haemophilus.html>>. Acesso em: 08 Out. 2008.

KYAW, C. M. Morfologia e ultraestrutura bacterianas. Disponível em: <<http://www.unb.br/ib/cel/microbiologia/morfologia1/pcgneg.gif>>. Acesso em: 14 mar. 2008.

KMETZSCH, C. I.; SCHERMANN, M. T.; SANTANA, J. C. B.; ESTIMA, C. L.; FARACO F. J.; SILVA C. M.; CONCEIÇÃO R. Meningites por *Haemophylus influenzae* b após a implantação da vacina específica. **J. Pediatr.**, v. 79, p. 530-536, 2003.

KUO, J. **Isolation and purification of polyribosyl ribitol phosphate from *Haemophilus influenzae* type b**. U.S. Patent 4.220.717, 1980.

LEE, A. L.; RIENSTRA, M. S.; MANGER, W. E.; SITRIN, R. D. **Process for converting lipid-containing bacterial capsular polysaccharide into lipid-free polysaccharide**. U.S. Patent 5.314.811, 1994.

LEWIS, J. M. **Endotoxin-Free Polysaccharides**. U. S. Patent 5.589.591, 1996.

LI, L.; LUO, R. G. Use of Ca^{+2} to re-aggregate lipopolysaccharide (LPS) in hemoglobin solutions and the subsequent removal of endotoxin by ultrafiltration. **Biotechnol. Tech.**, v. 12, n. 2, p. 119-122, 1998.

LOWRY, O. H.; ROSENBROUGH, N. J.; FARR, R. H. Protein measurement with Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, p. 265-275, 1951.

MAGALHÃES, P. O.; LOPES, A. M.; MAZZOLA, P. G.; RANGEL- YAGUI, C.; PENNA, T. C. V.; PESSOA, A. Jr.; Methods of Endotoxin Removal from Biological Preparations: a Review. **J. Pharm. Pharm. Sci.**, v. 10, n. 3, p. 388-404, 2007.

MANZONI, M.; BERGOMI, S.; ROLLINI, M.; CAVAZZONI, V.; FELISAZ, C.; MARINONI, C. Extracellular K5 polysaccharidic antigen recovery performed by different cell separation technologies. **Biotechnology**, v. 22, p. 759-766, 2000.

MERRIT, J.; ALLARD, G.; O'TOOLE, L.; SWARTZ, R.; LICARI, P. Development and scale-up of a fed-batch process for the production of capsular polysaccharide from *Haemophilus influenzae*. **J. Biotechnol.**, v. 81, p. 189-197, 2000.

MIRANZI, S. S. C.; MORAES, S. A.; FREITAS, I. C. M. Tendência das meningites por *Haemophilus influenzae* tipo b no Brasil, em menores de 5 anos, no período de 1983 a 2002. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 39, p. 473-477, 2006.

OSBORN, M. J. Studies on the gram- negative cell wall. I. Evidence for the role of 2- keto-3- deoxyoctonate in the lipopolisaccharide of *Salmonella typhimurium*. **Biochemistry**, v. 50, p. 499-506, 1963.

OZBEK, S.; MULLER, J. F.; FIGGEMEIER, E.; STETEFELD, J. Favourable mediation of crystal contacts by cocoamidopropylbetaine (CAPB). **Acta Crystallogr.**, v. 61, p. 477-480, 2005.

PACE, G. W. Microbial Gums. In: BU'LOCK, J. E.; KRISTIANSEN, B. **Basic Biotechnology**. London: Academic Press, 1987. p. 449-462.

PATO, T. P.; BARBOSA, A. P. R.; JUNIOR, J. G. S. Purification of capsular polysaccharide from *Neisseria meningitidis* serogroup C by liquid chromatography. **J. Chromatogr.**, v. 832, p. 262-267, 2006.

PESSOA Jr, A.; KILIKIAN, B. V. **Purificação de Produtos Biotecnológicos**. São Paulo: Manole. 2005.

PILLAI, S.; CICIRIELLO, S.; KOSTER, M.; EBY, R. Distinct pattern of antibody reactivity with oligomeric or polymeric forms of the capsular polysaccharide of *Haemophilus influenzae* type b. **Infect. Immun.**, v. 59, n. 12, p. 4371-4376, 1991.

PITTMAN, M. Variation and type specificity in the bacterial species *H. influenzae*. **J. Exp. Med.**, v. 53, p. 471-495, 1931.

PRATHER, K. J.; SAGAR, S.; MURPHY, J.; et al. Industrial scale production of plasmid DNA for vaccine and gene therapy: plasmid design, production, and purification. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 33, n. 7, p. 865-883, 2003.

PRAZERES, D. M. F.; FERREIRA, G. N. M. Design of flowsheets for the recovery and purification of plasmids for gene therapy and DNA vaccination. **Chem. Eng. Process.**, v. 43, p. 615-630, 2004.

REIS R. V.; ZYDNEY, A. Bioprocess membrane technology. **J. Memb. Sci.**, v. 297, p. 16–50, 2007.

RITZÉN, U.; ROTTICCI- MULDER, J.; STROMBERG, P.; SCHMIDT, S. R. Endotoxin reduction in monoclonal antibody preparations using arginine. **J. Chromatogr.**, v. 856, p. 343-347, 2007.

ROUSH, D. J.; LU, Y. Advances in primary recovery: Centrifugation and membrane Technology. **Biotechnol. Progress**, v. 24, p. 488-495, 2008.

SCOPES R. K. **Protein Purification: Principles and Practice**. 3rd ed. New York: Springer Verlag, 1994.

SOFER,G.; HAGEL, L. **Handbook of Process Chromatography: A guide and Optimization, Scale-up and Validation**. London: Academic Press, 1997.

SPECTRUM® LABORATORIES. **Why Spectrum? The Fiber with the Competitive Edge!** Disponível em: <<http://www.spectrapor.com/filtration/Edge.html>>. Acesso em: 3 Jun. 2008.

ST. GEME III, J. W.; CUTTER D. Influence of pili, fibrils, and capsule on in vitro adherence by *Haemophilus influenzae* type b. **Mol. Microbiol.**, v. 1, n. 1, p. 21-31, 1996.

TANIZAKI, M. M.; GARCIA, L. R.; RAMOS, J. B.; LEITE, L. C. C.; HISS, H.;FURUTA, J. A.; CABRERA-CRESPO, J.; RAW, I. Purification of meningococcal group C polysaccharide by a procedure suitable for scale-up. **J. Microbiol. Methods**, v. 27, p. 9-23, 1996.

TAKAGI, M. **Produção e purificação do polissacarídeo capsular de *Haemophilus influenzae* tipo b**. 117 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

TAKAGI, M.; CABRERA-CRESPO, J.; BARUQUE-RAMOS, J.; et al. Characterization of polysaccharide production of *Haemophilus influenzae* type b and its relationship to bacterial cell growth. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 110, p. 91-100, 2003.

TAKAGI, M.; CABRERA-CRESPO, J.; ZANGIROLAMI, T. C.; RAW, I.; TANIZAKI, M. M. Improved cultivation conditions for polysaccharide production by *H. influenzae* type b. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, v. 81, n. 2, p. 182-188, 2006.

TAKAGI, M.; TANIZAKI, M. M.; ZANGIROLAMI, T. C.; CABRERA-CRESPO, J. Improvement of simple cultivation conditions for polysaccharide synthesis by *Haemophilus influenzae* type b. In: MENDÉZ-VILAS, A. (Ed.). **Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology**. Sevilha: Formatex, 2007. v. 1, p. 602-608.

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. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 35, p. 1217-1222, 2008.

VAN HAM, S. M.; VAN ALPHEN, L.; MOOI, F. R.; VAN PUTTEN, J. P. M. Contribution of the major and minor subunits to fimbria-mediated adherence of *Haemophilus influenzae* to human epithelial cells and erythrocytes. **Infect. Immun.**, v. 63, n. 12, p. 4883-4889, 1995.

WARD, O. P. **Fermentation Biotechnology Principles: Process and Products**. England: John Wiley & Sons, 1989. p. 72-84.

WARD, O. P. **Bioprocessing**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1991.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Recommendations for the production and control of *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines**. Geneva: WHO, 2000. (Technical Report Series 897: 27 e 56).

YANG, F.; SHI, B.; MENG, F.; ZHANG, H. Membrane Fouling Behavior during filtration of sludge supernatant. **Environ. Progress**, v. 26, n. 1, p. 86-93, 2007.

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