DOUGLAS BORGES DE FIGUEIREDO

DESENVOLVIMENTO DO PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA A
DE SUPERFÍCIE DE PNEUMOCOCO DO CLADO 4 (PspA4Pro)

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

São Paulo
2014

DOUGLAS BORGES DE FIGUEIREDO

DESENVOLVIMENTO DO PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA A
DE SUPERFÍCIE DE PNEUMOCOCO DO CLADO 4 (PspA4Pro)

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

Orientadora: Dra. Viviane
Maimoni Gonçalves

Co-orientador: Dr. Joaquin
Cabrera-Crespo

Versão Original

São Paulo
2014

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

© reprodução total

Figueiredo, Douglas Borges de.

Desenvolvimento do processo de purificação da proteína A de superfície de pneumococo do clado 4 (PspA4Pro). / Douglas Borges de Figueiredo. -- São Paulo, 2014.

Orientador: 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 proteínas recombinantes.

Versão do título para o inglês: Development of the purification process of pneumococcal surface protein A clade 4 (PspA4Pro).

1. Proteína A de superfície de pneumococo 2. Streptococcus pneumoniae 3. Purificação de proteínas 4. Vacinas pneumocócicas 5. Brometo de cetiltrimetilamônio 6. Cromatografia líquida preparativa 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/SBIB0132/2014

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

Candidato(a): Douglas Borges de Figueiredo.

Título da Dissertação: Desenvolvimento do processo de purificação da proteína A
de superfície de pneumococo do clado 4 (PspA4Pro).

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, 18 de novembro de 2013

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto “Desenvolvimento do processo de purificação da proteína A de superfície do pneumococo do clado 4 (PspA4pro)”, protocolo nº. I-1156/13, sob a responsabilidade de Viviane Maimoni Gonçalves e Douglas Borges de Figueiredo, não envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica.

This is to certify that the proposal “Development of the purification process of pneumococcal surface protein A clade 4 (PspA4pro)”, protocol nº I-1156/13, under the responsibility of Viviane Maimoni Gonçalves and Douglas Borges de Figueiredo, has been reviewed by the Institute Butantan Animal Care and Use Committee, and that it does not involve breeding and/or use of animals belonging to phylum Chordata, subphylum Vertebrata, in scientific research.

Dr. Marcelo L. Santoro
Coordenador da CEUAIB

AGRADECIMENTOS

Tolkien escreveu, “É uma coisa perigosa, Frodo, sair porta afora. Você pisa na estrada, e, se não controlar seus pés, não há como saber aonde você pode parar”. A estrada percorrida foi, de fato, longa e não poucas vezes turbulenta. E se hoje eu cheguei aqui e você tem este manuscrito nas mãos, quero que saiba que ele só existe graças à ajuda de um grupo de cavalheiros e damas extraordinários, aos quais deixo meus agradecimentos nas linhas a seguir.

Começo agradecendo aos meus orientadores, a Dra. Viviane Maimoni Gonçalves e o Dr. Joaquin Cabrera-Crespo. Eu lhes agradeço não somente pelos ensinamentos, pela paciência, pelas críticas, pela ajuda nos experimentos, pela companhia nos congressos, pelas conversas na hora do almoço e pela amizade. Eu agradeço, principalmente, por me mostrarem o que é, de fato, ser um cientista, alguém dedicado a expandir os horizontes do conhecimento, não importando o quão hercúlea seja esta tarefa. Ter sido aluno de vocês foi uma honra inigualável.

Agradeço à minha mãe, Vera Lúcia, não só porque a minha existência não teria sido possível sem a interferência direta dela, mas principalmente por sempre ter estado ao meu lado, me apoiando frente a todas as adversidades e me incentivado a sempre buscar meus sonhos. Se algum dia alguém disser que eu fui uma pessoa digna, isso se deve a tudo o que eu aprendi com você. Agradeço também a Marina, não apenas por ser minha irmã, mas também minha amiga e companheira de filmes, jogos, passeios e consultora culinária. Minha tia Lourdes pelo carinho e pelo apoio, meus primos Maicol e Keyni pelos churrascos e por me mostrarem o que é o bom e velho rock’n roll. Agradeço aos meus avós, Maria, Sebastião, José e Idalina. Três de vocês já se foram, mas eu sei que, na eventual existência de um plano etéreo onde os humanos possam manter suas consciências após a morte corpórea, vocês ainda olham por mim. A família é grande e não dá para mencionar todo mundo, então qualquer membro não listado aqui, mas com quem eu me importo o bastante para ter adicionado no Facebook, considere-se recebedor dos meus agradecimentos.

Agora que já passamos pelos orientadores e pela família, vamos para a parte realmente divertida, os amigos de dentro e de fora do laboratório! Começando pelos de fora... Allan, Silvia, Mauricio, André, Nelson, Fábio, Felipe, Ricardo, Eduardo, Breno, Jaque, Guilherme, Fabrício, Giuliana e Ana. Se eu mantive minha sanidade nos últimos anos é em grande parte graças a vocês. Muito obrigado pela sua amizade e por tudo o que ela me trouxe de bom. Obrigado pelos jogos de RPG, pelas partidas de Arkham Horror e Legendary, pelos mangás e animes emprestados, pelas idas ao cinema, à Liberdade, à Comix, pelas noites assistido "O Jovem Indiana Jones", por todas as comidas gostosas que experimentamos e pelas viagens que fizemos. Dizem que os amigos são a família que nós escolhemos para nós mesmos, e eu não poderia ter escolhido melhor. E antes que eles comecem a reclamar, vamos ao pessoal do laboratório. Cada um de vocês é único e à sua maneira contribuiu não só com este trabalho, mas com o meu crescimento como pessoa. Agradeço à Anne, uma das pessoas mais alegre e verdadeiras que eu já conheci, ao Bruno com suas viagens psicodélicas Pink Floydianas que me fizeram ver muitas coisas sobre novos ângulos, ao Kdu, com quem eu posso conversar sobre tantas coisas, mas especialmente sobre Game of Thrones sem medo de dar spoilers, à Camila que ainda fala comigo mesmo depois de eu ter contado que o Ned Stark morria no primeiro livro e que ainda faz doces gostosos, ao Luciano pelas partidas de Magic e pelas piadas infames, à Thiara, que será eternamente a menina nova, pela paciência e pelo jeito animado de ser, à Vivi por continuar sendo minha amiga, mesmo que muitas vezes nossas visões de mundo sejam tão diferentes, à Paola pelo seu carinho e pelo seu respeito à natureza (não, ainda não pretendo virar vegetariano, mas a intenção foi boa). Ao Felipe, uma das pessoas mais inteligentes e capazes que eu já conheci, com quem posso conversar sobre os assuntos mais insólitos e sempre ter uma resposta, ou pelo menos uma desculpa para sair e ir comer uma palha, à Ste, dona de um dos melhores e mais ácidos sentidos de humor da história, além de um excelente gosto musical, à Fara, com tantas experiências a compartilhar com todos nós, à Mari e à Giovanna que foram sorrateiramente entrando no grupo e hoje já são do laboratório também, e a Rafa, a quem considero quase como uma irmãzinha e que me deu um golfinho rosa quando

eu mais precisava. De tudo o que eu ganhei nestes anos no laboratório, a amizade de vocês é de longe a coisa mais importante.

Agradeço aos nossos técnicos, Sr. Louri, Sr. Hélio, Sr. Máximo e à D. Ana por toda a ajuda que me deram e aos pesquisadores Dra. Mickie, Dra. Bete Sbrogio, Dra. Bete Cheng, Dra. Martha, Dr. Enéas e Dra. Milena, bem como aos seus alunos, pelos ensinamentos, paciência e ajuda com diversos experimentos.

Agradeço ao laboratório de Bioprocessos e aos demais laboratórios do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan pela estrutura disponibilizada e a Fundação de amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

Finalmente, mas não menos importante, eu agradeço a você, que está lendo esta tese, seja por acreditar que ela pode ajudar no seu trabalho ou apenas por mera curiosidade sobre o assunto, pois é isso que dá significado a este trabalho. Espero que ela lhe seja útil de alguma forma.

“Suppose that we are wise enough to learn and know—and yet not wise enough to control our learning and knowledge, so that we use it to destroy ourselves? Even if that is so, knowledge remains better than ignorance. It is better to know - even if the knowledge endures only for the moment that comes before destruction - than to gain eternal life at the price of a dull and swinish lack of comprehension of a universe that swirls unseen before us in all its wonder. That was the choice of Achilles, and it is mine, too.”

— [Isaac Asimov](#)

RESUMO

FIGUEIREDO, D. B. **Desenvolvimento do processo de purificação da proteína A de superfície de pneumococo do clado 4 (PspA4Pro)**. 2014. 118f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

A proteína A de superfície de pneumococo (PspA) é uma proteína ligante de colina encontrada na superfície de todas as cepas de *Streptococcus pneumoniae* e um importante fator de virulência, sendo candidata promissora para novas vacinas pneumocócicas. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um processo de purificação da PspA4Pro recombinante produzida em *Escherichia coli*. A metodologia de purificação proposta envolveu ruptura da biomassa celular, precipitação do homogenato obtido com o detergente catiônico brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), remoção do precipitado por centrifugação e, por fim, uma série de cromatografias. Foram testadas cromatografias de troca iônica (aniônica, catiônica), afinidade por metais, interação hidrofóbica e mista de troca catiônica e hidrofóbica. A precipitação com CTAB aumentou a pureza da PspA4Pro antes das etapas cromatográficas, mas a concentração de CTAB a ser utilizada variou de acordo com as características do material de partida e teve de ser determinada no início de cada processo de purificação para minimizar perdas de PspA4Pro nesta etapa. As cromatografias hidrofóbica e de afinidade acarretaram grande perda da PspA4Pro e pouco contribuíram para o aumento da pureza, sendo removidas do processo. Utilizando precipitação com CTAB, cromatografia de troca aniônica, crioprecipitação em pH4,0 e cromatografia de troca catiônica atingiu-se a pureza requerida de PspA4Pro (>95%) com recuperação entre 14% e 33%. Além disso, o processo proposto foi capaz de eliminar lipopolissacarídeo, alcançando níveis aceitáveis de endotoxina no produto final. A PspA4Pro purificada foi reconhecida por anticorpos, manteve sua capacidade de ligação à lactoferrina e sua estrutura secundária predominantemente de alfa-hélice.

Palavras-chave: *Streptococcus pneumoniae*. PspA. Purificação de proteínas. Cromatografia líquida preparativa. Brometo de cetiltrimetilamônio

ABSTRACT

FIGUEIREDO, D. B. **Development of the purification process of pneumococcal surface protein A clade 4 (PspA4Pro)**. 2014. 118p. Master Thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Pneumococcal surface protein A (PspA) is a choline binding protein found on the surface of all *Streptococcus pneumoniae* strains and an important virulence factor, being a promising candidate to be used in new pneumococcal vaccines. The objective of this work was to develop a purification process for a recombinant PspA4Pro produced in *Escherichia coli*. The proposed purification method consisted of cell disruption, precipitation of the homogenate with the cationic detergent cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), pellet removal by centrifugation and, finally, a series of liquid chromatographies. The chromatographic techniques tested were ion exchange (anionic and cationic), immobilized metal affinity, hydrophobic interaction and mix mode with hydrophobic and cationic ligands. CTAB precipitation increased PspA4Pro purity before the chromatographic steps, but CTAB concentration varied with the characteristics of the starting material and had to be determined for each purification process to minimize PspA4Pro loss. Hydrophobic and affinity chromatographies resulted in great loss of PspA4Pro with little increase of purity and were removed from the process. Using CTAB precipitation, anion exchange chromatography, crioprecipitation at pH4.0 and cation exchange chromatography, the desired PspA4Pro purity (>95%) was reached with recovery ranging from 14% to 33%. The developed process also removed lipopolysaccharide yielding acceptable levels of endotoxin in the final product. The purified PspA4Pro was recognized by antibodies, was able to bind lactoferrin and presented the characteristic secondary structure of alpha-helix.

Keywords: *Streptococcus pneumoniae*. *Pneumococcal surface protein A*. Protein purification. Preparative liquid chromatography. Cetyltrimethylammonium bromid

Lista de Figuras

Figura 1 A) Incidência anual mundial de doenças pneumocócicas em crianças menores de 5 anos (por 100000). B) Mortalidade anual mundial de doenças pneumocócicas em crianças menores de 5 anos não portadoras de HIV (por 100000 crianças).....	23
Figura 2 - A) Representação esquemática dos quatro domínios da PspA e de diferentes fragmentos de PspA, incluindo a PspA4Pro. B) Modelo da porção N-terminal da superfície da PspA. C) Esquema da disposição da PspA na superfície do pneumococo	27
Figura 3 - Representação esquemática de um homogeneizador de alta pressão	30
Figura 4 - Estrutura linear das resinas comumente utilizadas em cromatografia líquida preparativa de proteínas. A) Dextrana, B) Celulose, C) Agarose	33
Figura 5 - Esquema de ligação dos diferentes íons da amostra às cargas na resina de troca iônica	34
Figura 6 - Variação do pH na superfície da matriz em decorrência do efeito Donnan. A) Resina de troca aniônica, pH próximo a matriz (pH _m) > pH do tampão (pH _t) pela afinidade com hidroxilas. B) Resina de troca aniônica, pH _m < pH _t	35
Figura 7 - Eluição de uma HIC baseada num gradiente decrescente de sal. As proteínas são eluídas de acordo com sua hidrofobicidade	36
Figura 8 - Ligação da histidina a Ni ²⁺ imobilizado em IDA	38
Figura 9 - Ligante da resina Capto-MMC	39
Figura 10 - Diagrama de fluxo das estratégias de purificação testadas para PsA4Pro proveniente de diferentes cultivos Os quadros vermelhos representam as diferentes técnicas testadas em cada etapa do processo de purificação	43
Figura 11 - Sistema para ruptura celular. 1) Homogeneizador contínuo de alta pressão APV GAULIN; 2) Trocador de calor casco e tubo; 3) Funil encamisado. 4) Recirculador de fluido de refrigeração	44
Figura 12 - Äkta Avant utilizado nos processos cromatográficos executados .	47
Figura 13 - Sequência de operações realizadas durante o processo de purificação nº1	54

Figura 14 - Acompanhamento da ruptura celular e extração de proteínas no processo de purificação nº1	55
Figura 15 - Avaliação da clarificação em pH6,5 e pH4,0	55
Figura 16 - Pureza e recuperação de PspA4Pro nas frações do processo nº157	
Figura 17 - Compilação dos SDS-PAGE da purificação nº1. A) Padrão de peso molecular. B) Homogenato. C) Clarificado pH6,5. D) Q300. E) Crioprecipitado pH4,0. F) Sp1000. G) Fenil 750A	58
Figura 18 - Etapas eliminadas, etapas mantidas e conclusões retiradas dos resultados do processo de purificação nº1	59
Figura 19 - Sequência de operações realizadas durante o processo de purificação nº2.....	60
Figura 20 - Acompanhamento da ruptura celular, extração de proteínas e temperatura no processo de purificação nº2.	61
Figura 21 - Pureza e recuperação de PspA4Pro após precipitações com CTAB e diferentes pH nas etapas iniciais do processo de purificação nº2.	62
Figura 22 - Pureza e recuperação de PspA4Pro nas frações do processo nº263	
Figura 23 - Compilação dos SDS-PAGE da purificação nº2. A) Padrão de peso molecular. B) Homogenato. C) Clarificado pH6,5. D) Pellet ressuspendido do Clarificado pH6,5. E) Q100. F) Q300. G) Pool Crioprecipitação pH4,0. H) Pool SP. I) IMAC F1	65
Figura 24 - Etapas eliminadas, etapas mantidas e conclusões retiradas dos resultados do processo de purificação nº2.....	65
Figura 25 - Sequência de operações realizadas durante os processos de purificação nº3 e nº4.	66
Figura 26 - Acompanhamento da ruptura celular, extração de proteínas e temperatura dos processos de purificação nº3 e nº4.	66
Figura 27 - Evolução da pureza e recuperação da PspA4Pro no sobrenadante das amostras do homogenato da purificação nº4 com o aumento da concentração de CTAB.	68
Figura 28 - Pureza e recuperação de PspA4Pro nas frações do processo nº370	
Figura 29 - Pureza e recuperação de PspA4Pro nas frações do processo nº470	
Figura 30 - Compilação dos SDS-PAGE da purificação nº3. A) Padrão de peso molecular. B) Homogenato. C) Clarificado 0,2% CTAB. D) Q300. E) Crioprecipitado pH4,0. F) SP650. G) MMC F1.....	71

Figura 31 - Compilação dos SDS-PAGE da purificação nº4. A) Padrão de peso molecular. B) Homogenato. C) Clarificado 0,2% CTAB. D) Q300. E) Crioprecipitado pH4,0. F) SP650. G) MMC250.	72
Figura 32 - Comparação entre Q-Sepharose e Capto-MMC após a clarificação com CTAB 0,2% do material proveniente do processo de purificação nº 4.....	72
Figura 33 - Comparação da SP-Sepharose e da Capto-MMC após a crioprecipitação em pH4,0 do material proveniente do processo de purificação nº 4.....	73
Figura 34 - Sequência de operações das purificações nº3 e 4 e conclusões retiradas dos resultados destes processos.	74
Figura 35 - Sequência de operações realizadas durante o processo de purificação nº5.....	75
Figura 36 - Acompanhamento da ruptura celular, extração de proteínas e temperatura no processo de purificação nº5.	76
Figura 37 - Condutividade e viscosidade do sobrenadante das amostras precipitadas com diferentes concentrações de CTAB no processo de purificação nº 5.....	76
Figura 38 - Pureza e recuperação de PspA4Pro nas frações do processo nº578	
Figura 39 - Compilação dos SDS-PAGE da purificação nº5. A) Padrão de peso molecular. B) Homogenato. C) Clarificado 0,15% CTAB. D) Q300. E) Crioprecipitado pH4,0. F) SP1000.....	79
Figura 40 - Comparação entre as cromatografias de troca aniônica e mista após a clarificação com CTAB 0,15%.	80
Figura 41 - Comparação entre as cromatografias de troca catiônica e mista após a crioprecipitação em pH4,0	81
Figura 42 - Etapas eliminadas, etapas mantidas e conclusões retiradas dos resultados do processo de purificação nº5.....	81
Figura 43 - Sequência de operações realizadas durante a purificação nº6.....	82
Figura 44 - Acompanhamento da ruptura celular, extração de proteínas e temperatura no processo de purificação nº6.	83
Figura 45 - Pureza e recuperação de PspA4Pro nas frações do processo nº685	
Figura 46 - Compilação dos SDS-PAGE da purificação nº6. A) Padrão de peso molecular. B) Homogenato. C) Clarificado 0,085% CTAB. D) Q300. E) Crioprecipitado pH4,0. F) Pool SP1000	86

Figura 47 - Cromatograma da gel filtração da fração Pool SP da purificação nº6 realizada para confirmar que a pureza de PspA4Pro foi atingida.....	87
Figura 48 - Comparação entre as cromatografias de troca aniônica e mista como primeira etapa cromatográfica do processo de purificação após a clarificação no processo de purificação nº6.	88
Figura 49 - Comparação entre a cromatografia de troca catiônica após crioprecipitação em pH4,0 e a cromatografia mista após a crioprecipitação em pH5,5.....	89
Figura 50 - Etapas eliminadas, etapas mantidas e conclusões retiradas dos resultados do processo de purificação nº6.....	89
Figura 51 - Evolução da A280 e DO600 normalizadas pela concentração de biomassa rompida nos processos de purificação nº1, nº5 e nº6.....	90
Figura 52 - Sequência de operações realizadas na purificação nº7.....	93
Figura 53 - Acompanhamento da ruptura celular, extração de proteínas e temperatura no processo de purificação nº7.....	93
Figura 54 - Avaliação das amostras do Homogenato do processo de purificação nº7 precipitadas com CTAB.....	94
Figura 55 - Massa e altura do precipitado do Homogenato ao final do teste de precipitação com CTAB.....	95
Figura 56 - Pureza e recuperação de PspA4Pro nas frações do processo nº7	96
Figura 57 - Western Blot da purificação nº7. A) Três massas distintas de PspA4Pro foram aplicadas ao SDS-PAGE e transferidas para a membrana. B) Repetição do Western Blot para confirmação do resultado e padrão de peso molecular de proteínas.....	97
Figura 58 - Compilação dos SDS-PAGE da purificação nº7. A) Padrão de peso molecular. B) Homogenato. C) Clarificado 0,1% CTAB. D) Q300. E) Crioprecipitado pH4,0. F) SP650. G) SP1000. G) Pool SP.....	97
Figura 59 - Estratégia proposta para purificação PspA4Pro.....	100
Figura 60 - Ligação PspA4Pro com lactoferrina. A) 2 mg/mL PspA4Pro pura (verde) e 1mg/mL Lactoferrina (azul escuro); B) 2 mg PspA4Pro + 0,5 mg Lactoferrina (vermelho), 1mg PspA4Pro + 1mg Lactoferrina (verde), 1mg PspA4Pro + 2 mg Lactoferrina (azul escuro).....	101
Figura 61 - Elipticidade Molar da PspA4Pro, em diferentes comprimentos de onda, na presença e ausência de CTAB.....	103

Figura 62 - Elipticidade Molar da PspA4Pro, em diferentes comprimentos de onda, em amostra que passou por aquecimento e resfriamento e em amostra sem tratamento térmico.....	103
Figura 63 - Mudança na estrutura da PspA4Pro com a variação da temperatura da amostra	104
Figura 64 - Alteração da estrutura da PspA4Pro durante o aquecimento e resfriamento entre 15°C e 50°C e entre 40°C e 95°C.	105
Figura 65 - Elipticidade molar da PspA4Pro em diferentes valores de pH.	107

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Vacinas pneumocócicas atualmente em uso	25
Tabela 2 - Diferentes tipos de matrizes utilizadas em resinas cromatográficas.....	32
Tabela 3 - Cultivos realizados para produção e purificação de PspA4Pro	41
Tabela 4 - Tabela de purificação do processo nº1	56
Tabela 5 - Tabela de purificação do processo nº 2	63
Tabela 6 - Pureza de PspA4Pro nas diferentes concentrações de CTAB testadas no Homogenato da purificação nº3.....	67
Tabela 7 - Tabela de purificação do processo nº3.....	69
Tabela 8 - Tabela de purificação do processo nº4.....	69
Tabela 9 - Tabela de purificação do processo nº 5.....	77
Tabela 10 - Testes de clarificação do processo de purificação nº 6.	84
Tabela 11 - Tabela de purificação do processo nº 6	85
Tabela 12 - Tabela de purificação do processo nº7	95
Tabela 13 - Resumo dos resultados finais dos 7 processos de purificação.....	99
Tabela 14 - TM da PspA4Pro em intervalos de temperatura distintos.	105
Tabela 15 - Estruturas secundárias da PspA4Pro obtidas por diferentes algoritmos de deconvolução.....	106
Tabela 16 - Quantificação de endotoxina ao longo do processo de purificação nº7	108

Lista de Símbolos e Abreviaturas

A280 – Absorbância a 280nm

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BSA - *bovine serum albumin* (albumina do soro bovino)

CIP – Cleaning in Place (limpeza *in situ*)

Crio-pH4,0 – Crioprecipitado em pH4,0

Crio-pH5,5 – Crioprecipitado em pH5,5

CTAB - Brometo de cetiltrimetilamônio

Cx – Concentração bacteriana em gramas de células secas por litro de cultivo

DAB – Diaminobenzidina

Ø – diâmetro da coluna cromatográfica

DO600 – Densidade ótica a 600nm

EDTA – Ácido etilenodiamina tetraacético

EPP - Eficiência do processo de purificação

FDA – Food and Drug Administration

FenilF1 – Fração não adsorvida da Fenil-Sepharose

FenilX – Eluição da Fenil-Sepharose na concentração XmM de sulfato de amônio

FPe – Fator de purificação da PspA por etapa no processo de purificação

FPg – Fator de purificação geral de PspA no processo de purificação

IDA - Acido iminodiacético

IMAC - Cromatografia de Afinidade por Metais Imobilizados

IMACF1 – Fração não adsorvida da IMAC

HIC - Cromatografia de interação hidrofóbica

Lc – Altura do leito cromatográfico

LPS – Lipopolissacarídeo (pirogênio)

MMC – Cromatografia de modo misto

MMCX - Eluição da Capto-MMC na concentração de XmM L-arginina

P – Proteínas totais

pI – Ponto isoelétrico da proteína

PMSF – Fluoreto de fenilmetilsulfonil (*Phenylmethilsulphonyl Fluoride*)

pHm – pH na região próxima à matriz cromatográfica

pHt – pH do tampão da cromatografia

PS – polissacarídeo capsular

PspA – Proteína A de superfície do pneumococo

PspA4Pro – fragmento clonado da PspA do clado 4 contendo apenas a primeira porção da região rica em prolina

QF1 – Fração não adsorvida da Q-Sepharose

QX - Eluição da Q-sepharose na concentração de XmM NaCl

SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio

Rce – Recuperação de proteína por etapa no processo de purificação

Rcg – Recuperação geral de proteína no processo de purificação

SIP – *Sanitization in Place* (sanitização *in situ*)

SPF1 – Fração não adsorvida da SP-Sepharose

SPX – Eluição da SP-Sepharose na concentração de XmM NaCl

UV – Ultravioleta

VC – Volume da coluna cromatográfica

Sumário

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	21
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1	Doenças pneumocócicas e novas vacinas	23
2.2	Proteína A de superfície do pneumococo (PspA)	25
2.3	Purificação de bioprodutos	28
2.4	Purificação de proteínas intracelulares	29
2.5	Precipitação em processos de purificação	30
2.6	Cromatografia líquida	31
2.6.1	<i>Conceitos básicos</i>	31
2.6.2	<i>A fase estacionária</i>	32
2.6.2.1	<u>Propriedades da Matriz</u>	32
2.6.4	<i>Cromatografia de troca iônica</i>	33
2.6.5	<i>Cromatografia de interação hidrofóbica</i>	35
2.6.6	<i>Cromatografia de Afinidade por Metais Imobilizados (IMAC)</i>	36
2.6.7	<i>Cromatografia mista</i>	38
3	OBJETIVOS	40
3.1	Geral	40
3.2	Específicos	40
4	MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1	Material de partida	41
4.2	Quantificação de proteínas totais e determinação da pureza da PspA4Pro	42
4.3	Estratégia de purificação	42
4.4	Ruptura celular	44
4.5	Clarificação	45
4.5.1	<i>Determinação da concentração de CTAB a ser empregada na clarificação</i>	45
4.6	Cromatografia de troca aniônica em Q-Sepharose	46
4.7	Crioprecipitação pH4,0	47
4.8	Cromatografia de troca catiônica em SP-Sepharose	48
4.9	Cromatografia hidrofóbica em Fenil-Sepharose	48
4.10	Cromatografia de afinidade por metais em IMAC-Níquel	49

4.11 Cromatografia mista Capto-MMC	49
4.12 Parâmetros de avaliação dos processos cromatográficos.	51
4.13 Atividade da PspA4Pro após a purificação.....	52
4.14 Determinação da massa molecular da PspA4Pro por CLAE.....	52
4.15 Estrutura secundária e estabilidade térmica e ao pH da PspA4Pro purificada.....	53
4.16 Remoção de endotoxina.....	53
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
5.1 Processo de purificação nº1 (Cultivo 1).....	54
5.2 Processo de purificação nº2 (Cultivo 2).....	59
5.3 Processos de purificação nº3 e nº4 (Cultivos 3 e 4)	65
5.3.1 <i>Avaliação da inclusão da cromatografia mista na sequência de etapas do processo nº4</i>	72
5.4. Processo de purificação nº 5 (Cultivo 1).....	75
5.4.1 <i>Testes com Capto-MMC após a clarificação e após crioprecipitação</i>	79
5.5 Processo de purificação nº6 (Cultivo 1).....	81
5.5.1 <i>Testes com Capto-MMC após a clarificação e após crioprecipitação</i>	87
5.6 Comparação entre os processos de purificação nº1, nº5 e nº6 realizados a partir do Cultivo 1	90
5.7 Processo de purificação nº7 (Cultivo 4).....	92
5.8 Comparação geral dos sete processos de purificação	99
5.9 Atividade da PspA4Pro purificada	100
5.10 Determinação da massa molecular da PspA4Pro por CLAE.....	102
5.11 Estrutura secundária e estabilidade térmica e ao pH da PspA4Pro purificada.....	102
6 CONCLUSÕES	109
REFERÊNCIAS*	111

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Fundado em 1901, o Instituto Butantan, vinculado à Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo, é hoje um dos maiores centros de pesquisa biomédica do Brasil, além de um grande produtor de soros e vacinas, responsável por mais de 90% da produção destes no Brasil. Dentre a produção do Instituto destacam-se as vacinas contra tétano e difteria, infantis e adultas, hepatite B recombinante, pertussis, influenza sazonal, H1N1 e H5N5. Além da produção, o Instituto também se dedica a estudos e pesquisas na área de Biotecnologia, relacionados, direta ou indiretamente, com a saúde pública.

Dentre as pesquisas realizadas no Instituto Butantan está o desenvolvimento de uma nova vacina pneumocócica conjugada, projeto ao qual este trabalho de mestrado está relacionado. A importância de se procurar novas estratégias para o combate às doenças causadas por *Streptococcus pneumoniae*, como pneumonia, bacteremia, sepse e meningite, está no fato de que, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) estas doenças constituem um dos maiores problemas de saúde pública do mundo. Estima-se que no ano 2000 ocorreram cerca de 14,5 milhões de casos de doenças pneumocócicas invasivas, resultando em 826.000 mortes de crianças menores de 5 anos (O'BRIEN, 2009).

As vacinas pneumocócicas atualmente em uso são constituídas de polissacarídeos (PS) da cápsula do *S. pneumoniae* livres ou conjugados a uma proteína carregadora. A conjugação do PS a uma proteína o transforma de um antígeno que induz uma resposta imune timo-independente para timo-dependente, e que, portanto, induz resposta imune em crianças abaixo de 2 anos, que é o principal grupo de risco. Atualmente, duas vacinas conjugadas, com PS de 10 e 13 sorotipos de *S. pneumoniae* (PCV10 e PCV13) e uma vacina não conjugada contendo PS de 23 sorotipos diferentes de *S. pneumoniae* (PPV23) são comercializadas internacionalmente, porém a PPV23 não dá proteção para menores de 2 anos e a proteção é questionável para menores de 5 e maiores de 65 anos, enquanto que as vacinas conjugadas têm baixa cobertura de sorotipos e alto custo.

Uma vacina conjugada contendo PS de poucos sorotipos conjugados a proteínas do próprio pneumococo como carregadoras poderia aumentar a cobertura vacinal com poucos componentes antigênicos. Uma das proteínas candidatas é a proteína A de superfície do pneumococo (PspA), uma proteína de superfície que projeta-se para fora da capsula do microrganismo. Esta proteína é bastante conservada entre as cepas e tem apresentado boa imunogenicidade e proteção em ensaios em animais. Assim, um projeto temático foi proposto pelo Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan para o estudo de diferentes aspectos relacionados ao desenvolvimento de uma vacina pneumocócica composta de conjugados PS-PspA.

Neste trabalho serão apresentadas as estratégias testadas para purificar um fragmento de PspA recombinante de modo a usá-lo na produção de vacinas pneumocócica, conjugadas ou de proteína livre, bem como sua caracterização e atividade após o processo de purificação.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Doenças pneumocócicas e novas vacinas

Embora a colonização da nasofaringe por *Streptococcus pneumoniae*, ou pneumococo, seja bastante comum e geralmente assintomática, a invasão de outros nichos por este microrganismo pode levar a doenças graves como bacteremia, meningite e sepse. Anualmente estas doenças levam a óbito cerca de 1,6 milhões de pessoas no mundo todo, especialmente crianças menores de 5 anos (Figura 1), idosos com mais de 65 anos e indivíduos imunocomprometidos. A incidência e a mortalidade das doenças pneumocócicas são especialmente elevadas nos países subdesenvolvidos, onde o acesso a tratamentos médico hospitalares é menor quando comparado àquele dos países desenvolvidos. (MADHI et al., 2008).

Figura 1 A) Incidência anual mundial de doenças pneumocócicas em crianças menores de 5 anos (por 100000). B) Mortalidade anual mundial de doenças pneumocócicas em crianças menores de 5 anos não portadoras de HIV (por 100000 crianças)

Fonte: (Adaptado de WHO, 2009).

Nas últimas décadas, a resistência do pneumococo à penicilina e a outros antimicrobianos tem aumentado em vários países (MANGTANI et al., 2003). Por este motivo, a prevenção através da vacinação é a estratégia mais indicada para diminuir as taxas de incidência e de mortalidade da doença (WHO, 2007).

Todas as vacinas pneumocócicas atualmente em uso têm como base PS de *S. pneumoniae*, estejam eles livres ou conjugados a uma proteína. Uma vez que PS são antígenos timo-independentes, a vacina de PS-livres, PPV23, embora tenha boa cobertura contra os diversos sorotipos do pneumococo, apresenta algumas características desfavoráveis (MANTESE et al., 2003):

1. Não ativa as células de memória;
2. Induz níveis variáveis de anticorpos, sendo estes, predominantemente IgM;
3. Produz baixa resposta imune em crianças, principalmente nos menores de dois anos por não estimular a maturação clonal;
4. Os anticorpos produzidos são de baixa avidéz.
5. A proteção é limitada aos sorotoripos cujos PS foram incluídos na vacina, tornando a eficácia da vacina limitada a regiões onde tais sorotipos são predominantes.

A conjugação do PS a uma proteína transforma a natureza deste antígeno de T-independente em T-dependente, permitindo seu uso em crianças menores de 2 anos de idade. As vacinas conjugadas atualmente em uso são compostas por 10 ou 13 PS de diferentes sorotipos (Tabela 1), cada um deles ligados quimicamente a uma proteína carregadora não relacionada à doença, como a proteína D de *Haemophilus influenzae*, toxoide tetânico ou anatoxina diftérica CRM₁₉₇, no caso da vacina 10-valente, e a anatoxina diftérica CRM₁₉₇ na vacina 13-valente (MANGTANI et al, 2003). Embora estas vacinas apresentem boa proteção, ela é limitada aos sorotipos cujos PS foram conjugados. Embora PS de outros sorotipos possam ser inclusos, isso aumentaria o custo de produção da vacina.

Tabela 1 - Vacinas pneumocócicas atualmente em uso

Vacina	Tipo	Polissacarídeos	Proteína carreadora
23-valente	Polissacarídeos livres	1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 20, 22F, 23F, 33F	Não se aplica
10-valente	Conjugada	1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C*, 19F [#] , 23F	Proteína D (<i>H. influenzae</i>), * Toxóide tetânico, [#] Anatoxina diftérica CRM ₁₉₇
13-valente	Conjugada	1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F	Anatoxina diftérica CRM ₁₉₇

Uma estratégia para reduzir o custo de produção de uma vacina pneumocócica conjugada mantendo uma cobertura elevada seria a remoção de alguns PS, deixando somente os prevalentes no Brasil, e usar proteínas do próprio pneumococo como carregadoras, que seriam ligadas covalentemente aos PS. O projeto temático (FAPESP n° 2008/05207-4), ao qual este trabalho está relacionado, propõe desenvolver processos de produção e purificação dos PS dos sorotipos prevalentes do Brasil, além dos processos de produção e purificação das proteínas carregadoras recombinantes e sua conjugação aos PS purificados.

Uma vez que proteínas de superfície são antígenos conservados entre diferentes cepas de pneumococo, vacinas produzidas com proteínas de superfície purificadas representam uma alternativa para a imunização de ampla cobertura contra o pneumococo.

2.2 Proteína A de superfície do pneumococo (PspA)

A superfície do pneumococo consiste em três estruturas distintas: membrana plasmática, parede celular e cápsula polissacarídica. A membrana plasmática apresenta estrutura conservada, com moléculas de ácido

lipoteicóico inseridas na bicamada lipídica. A parede celular é composta por peptidoglicanos e contém ácidos teicóico e lipoteicóico, que são responsáveis pela resposta inflamatória intensa observada na infecção por pneumococo e que possuem resíduos de colina, onde as proteínas ligantes de colina, como a PspA, ficam ancoradas.

Dentre os antígenos proteicos candidatos ao uso em vacinas pneumocócicas, a PspA tem se mostrado bastante promissora, principalmente por ser uma proteína exposta externamente à capsula polissacarídica. Além de possuir um domínio de ligação à colina, a PspA apresenta a propriedade de interferir na ação do complemento, bloqueando a via alternativa pela redução da quantidade de C3b, reduzindo desta forma a capacidade do hospedeiro de eliminar a bactéria (BEAL et al., 2000). Ela também apresenta a capacidade de se ligar à lactoferrina, uma glicoproteína da família da ferritina que faz parte do sistema imune inato, impedindo sua ação bacteriostática e bactericida (SENKOVICH et al., 2007).

Experimentos de desafio em camundongos imunizados com a PspA, demonstraram elevada proteção oferecida por essa proteína (VANDESILHO et al., 2012). A imunização intramuscular de voluntários humanos com PspA usando hidróxido de alumínio como adjuvante induziu a produção de IgG anti-PspA e o soro dos indivíduos imunizados protegeu camundongos desafiados com pneumococo de diferentes sorotipos (MIYAJI et al., 2013).

Com base na homologia e no alinhamento das sequências de aminoácidos de PspA de diferentes cepas de *S. pneumoniae*, foram observadas 3 famílias distintas desta proteína, as quais podem ser divididas em 6 grupos, denominados clados. A família 1 da PspA é constituída por dois clados: 1 e 2, a família 2, por três clados: 3, 4 e 5 e a família 3, por apenas um clado: 6 (BRILES et al., 1997).

A estrutura da PspA é composta por quatro domínios. A porção N-terminal é bastante carregada eletricamente e apresenta estrutura secundária predominantemente do tipo α -hélice. Esta porção se projeta para fora da superfície do microrganismo e nela encontra-se a região definidora de clado. Em seguida há um domínio rico em prolinas de comprimento variável que pode estar intermediado por trechos sem prolina intercalados. A ele segue-se um domínio com 10 repetições de uma sequência de 20 aminoácidos, responsável

pela ligação à colina, ancorando a proteína aos resíduos de colina encontrados nos ácidos teicóico e lipoteicóico da parede celular. A porção C-terminal é composta por uma cauda hidrofóbica (Figura 2) (JEDRZEJAS et al., 2001).

Figura 2 - A) Representação esquemática dos quatro domínios da PspA e de diferentes fragmentos de PspA, incluindo a PspA4Pro. B) Modelo da porção N-terminal da superfície da PspA. C) Esquema da disposição da PspA na superfície do pneumococo

As cores representam a magnitude do potencial eletrostático: azul, eletropositivo; vermelho, eletronegativo.

Fonte: Adaptado de JEDRZEJAS et al., 2001 e de MORENO et al., 2010.

Para realização deste trabalho foi empregado um fragmento da PspA do clado 4 que contém a porção N-terminal, a região definidora de clado e o primeiro trecho da região rica em prolina, sem peptídeo sinal e sem domínio de ligação à colina, denominado PspA4Pro, obtido pela Dra. Eliane Miyaji do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan. Este fragmento possui massa

molecular calculada de 40kDa, ponto isoelétrico predito de 4,8 e sua construção foi feita sem cauda de histidina.

2.3 Purificação de bioprodutos

A purificação de um bioproduto envolve uma série de operações sequenciais que se baseiam nas diferenças das propriedades físico-químicas do produto de interesse e das impurezas presentes, de forma a enriquecer progressivamente o produto e a eliminar os componentes indesejados.

No processo de purificação, o produto bruto é separado até obter-se o grau de pureza requerido para seu uso, buscando-se maximizar sua recuperação e minimizar seu custo (WARD, 1999). Além da pureza relativa, os produtos biotecnológicos normalmente apresentam requerimentos em relação à quantidade de impurezas como ácidos nucleicos e pirógenos, limites relativos à coloração, ausência de atividade enzimática nociva ao produto e ao seu uso (ex: proteases, atividade hemolítica). Se o produto possui similares, estas normas são fornecidas pela ANVISA (Agência de Vigilância Sanitária), FDA (*Food and Drug Administration*), OMS (Organização Mundial da Saúde) ou pelas Farmacopeias. O custo das etapas de purificação de produtos biotecnológicos pode variar de 20 a 80% do custo total do produto, dependendo da quantidade presente no material de partida e do grau de pureza exigido (JANSON, 1990; SCOPES, 1994; SOFER, 1997).

Atualmente as tecnologias descartáveis aplicadas à purificação de proteínas, como colunas cromatográficas de único uso, estão ganhando espaço por não demandarem tempo e gasto com limpeza e por facilitarem a validação do processo. Contudo, dado o seu custo e o grande número de cromatografias a serem realizadas antes de se estabelecer um processo definitivo de purificação, muitas vezes os processos tradicionais ainda são a primeira opção. Assim, todas as resinas e aparelhos utilizados devem passar por procedimentos de limpeza e sanitização *in situ* (*Cleaning in Place*, CIP e *Sanitization in Place*, SIP) após o uso e devem apresentar estabilidade e resistência para tal.

Dentre as técnicas comumente utilizadas na purificação industrial de proteínas, a precipitação e a cromatografia líquida preparativa estão entre as mais importantes.

2.4 Purificação de proteínas intracelulares

Quando a proteína que se deseja purificar é intracelular, ou seja, não é secretada pela célula, o primeiro passo da purificação é a extração desta proteína através da ruptura das células. Existem diversas técnicas de ruptura celular e sua escolha depende de fatores como o tamanho da célula, sua resistência a tensões de cisalhamento, o volume do material de trabalho e a suscetibilidade do produto de interesse a variações de temperatura e pH.

Os métodos de ruptura celular são geralmente divididos em: 1) mecânicos, como homogeneizador contínuo de alta pressão, prensa de *French*, moinho de bolas e ultrassom; 2) não mecânicos, como congelamento/descongelamento, choque osmótico e por temperatura; 3) químicos, através da adição de álcalis ou detergentes; e 4) enzimáticos. Também é comum haver combinações de métodos distintos de ruptura.

No homogeneizador contínuo de alta pressão a suspensão bacteriana é comprimida por um pistão. A suspensão sai através de um poro estreito para uma câmara de maior volume onde as células se chocam com uma superfície rígida (Figura 3). A variação brusca de pressão e o impacto com a superfície levam ao rompimento das células. O rompimento mecânico em homogeneizador de alta pressão tem as vantagens de ser facilmente escalonado, não adicionar enzimas ou solventes orgânicos ao meio, que teriam que ser removidos nas etapas de purificação seguintes, de não alterar o pH da solução e de permitir a recirculação da mistura de células, melhorando a eficiência do rompimento. Contudo, ele tem a desvantagem de aumentar a temperatura do homogeneizado, o que pode levar à desnaturação do produto. Isso pode ser evitado acoplando o aparelho a um sistema de refrigeração.

Figura 3 - Representação esquemática de um homogeneizador de alta pressão

Fonte: Adaptado de SUBSTECH, 2013

Após a ruptura, os restos celulares podem ser removidos por centrifugação ou filtração. Uma vez que a mistura obtida, comumente chamada de homogenato, contém todas as proteínas solúveis presentes na célula, é importante garantir que a proteína de interesse não sofra a ação de proteases. Isso pode ser feito pela redução da temperatura e/ou pela adição de inibidores de protease. Além disso, a amostra deve seguir rapidamente para as etapas seguintes de purificação para evitar degradação da proteína de interesse e crescimento microbiano.

2.5 Precipitação em processos de purificação

A precipitação visa converter moléculas solúveis a insolúveis através da manipulação das condições da solução para que estas possam ser subsequentemente removidas por técnicas de separação sólido/líquido simples, como centrifugação ou filtração. O alvo da precipitação pode ser tanto a molécula de interesse, que será ressolubilizada após a separação, como os contaminantes, descartados após a separação. Embora seja uma técnica com baixa especificidade, a precipitação deve, idealmente, resultar em aumento da pureza e/ou na concentração do produto, além de remover contaminantes que possam interferir em outras etapas do processo de purificação, como as

cromatografias. Desta forma, a precipitação é normalmente utilizada como um dos primeiros passos do processo de purificação (HILBRIG, 2003).

Existem vários métodos para reduzir a solubilidade de uma proteína. A precipitação por sais iônicos, com sulfato de amônio, por exemplo, é uma das técnicas mais utilizadas, bem como precipitação através da mudança de temperatura, pH, íons metálicos (Cu^{2+} , Zn^{2+}), polímeros não iônicos (polietileno glicol), solventes orgânicos (etanol, acetona), entre outros (HARRISON, 1993).

Detergentes são largamente utilizados na purificação de bioprodutos. Seu uso engloba a lise celular, extração de proteínas de membrana e a precipitação ou solubilização de biomoléculas. Brometo de cetiltrimetilamonio (CTAB) é um detergente catiônico com afinidade por moléculas de alto peso molecular carregadas negativamente, como ácidos nucleicos, polissacarídeos e lipopolissacarídeos (LPS), comumente utilizado na purificação de plasmídeos (LANDERS et al., 2002), RNA (TAMANEE et al., 2004) e polissacarídeos (MICOLI et al., 2011). Sua afinidade por LPS e ácidos nucleicos o torna um bom agente precipitante a ser utilizado antes da aplicação da amostra a colunas de troca aniônica, reduzindo a concentração de espécies competindo pelos ligantes da resina. Embora o uso de CTAB na extração de proteínas intracelulares já tenha sido relatado (HELLER, 1968), seu uso na purificação de proteínas ainda é pouco documentado.

2.6 Cromatografia líquida

2.6.1 *Conceitos básicos*

O termo cromatografia refere-se a um conjunto de técnicas de separação que são caracterizadas pela distribuição das moléculas a serem separadas entre duas fases, uma estacionária e uma móvel. As moléculas com maior afinidade pela fase estacionária ficam retidas, passando pelo sistema com menor velocidade do que aquelas com maior afinidade pela fase móvel, dando-se assim a separação (JANSON, 1990).

A configuração mais usual de uma cromatografia líquida consiste na fase estacionária ficar empacotada dentro de um tubo, a coluna cromatográfica, enquanto a fase móvel, ou eluente, é bombeada através da coluna. A amostra a ser separada é aplicada em uma das extremidades da coluna e os

componentes, que a atravessam com velocidades diferentes, são detectados, usualmente por UV, e coletados em diferentes frações.

2.6.2 A fase estacionária

A fase estacionária é composta por duas partes distintas, uma matriz porosa e um ligante, que pode estar ligado diretamente na matriz, ou através de moléculas espaçadoras.

2.6.2.1 Propriedades da Matriz

A matriz ideal a ser utilizada na cromatografia líquida de proteínas deve ser insolúvel e não deve conter grupos que se liguem inespecificamente às proteínas. Ademais, ela deve ser química e fisicamente estável para ser compatível com os procedimentos de CIP e SIP, e rígida o bastante para permitir altas taxas de fluxo linear em colunas empacotadas com partículas de poucos micrometros de diâmetro.

Os materiais que compõem as matrizes podem ser classificados em inorgânicos, polímeros orgânicos sintéticos ou polissacarídeos. A Tabela 2 exemplifica algumas matrizes de cada um destes tipos (JANSON, 1990).

Tabela 2 - Diferentes tipos de matrizes utilizadas em resinas cromatográficas

Tipo de Matriz	Composição
Inorgânica	Sílica porosa
	Hidroxiapatita
	Vidro poroso
Polímeros orgânicos sintéticos	Poliacrilamida
	Polimetacrilamida
	Poliestireno
Polissacarídeos	Celulose
	Dextrana
	Agarose

As matrizes mais utilizadas na separação de proteínas são aquelas baseadas em polissacarídeos neutros e poliacrilamida. Embora já tenham sido

largamente utilizadas, as matrizes de celulose estão caindo em desuso por serem propensas a sofrer compactação durante a cromatografia. Atualmente dextrana e agarose são as matrizes mais utilizadas em todos os tipos de cromatografia líquida preparativa de proteínas. As matrizes de agarose têm as vantagens de não se ligarem às biomoléculas de forma significativa, permitirem alto fluxo e resistirem a extremos de pH, força iônica e altas concentrações de agentes denaturantes. Exemplos de matrizes de agarose produzidas comercialmente são a Sepharose (cross-linked agarose), Superose (highly cross-linked agarose) e Superdex (dextrana ligada covalentemente à agarose) (Figura 4) (FREIFELDER, 1982).

Figura 4 - Estrutura linear das resinas comumente utilizadas em cromatografia líquida preparativa de proteínas. A) Dextrana, B) Celulose, C) Agarose

Fonte: Adaptado de JANSON, 1990.

2.6.4 Cromatografia de troca iônica

A cromatografia de troca iônica é tradicionalmente a técnica de separação de proteínas mais utilizada (BONNERJEA, 1986). As razões para a popularidade desta técnica incluem boa resolução, boa capacidade de ligação das proteínas, versatilidade, uma vez que existem diversos tipos de ligantes disponíveis, além de permitir grande variação na composição dos tampões utilizados e a facilidade de execução. O princípio da cromatografia de troca iônica é a competição entre os íons de interesse e os demais pelos grupos de carga oposta na resina (Figura 5).

A interação entre as moléculas e o trocador iônico depende das cargas de ambas as partes e da força iônica do meio. Quando a concentração de íons competindo pelas cargas da fase estacionária é baixa, os íons de interesse ficam retidos. Quando esta competição aumenta, eles são eluídos. Contudo, a interação entre proteínas e o trocador iônico não depende somente da carga e da força iônica, mas também da distribuição das cargas na superfície da proteína, do pH, da natureza dos íons no solvente, aditivos como solventes orgânicos e as propriedades do trocador de íons. Dentre estes fatores os mais importantes são a concentração de íons (força iônica) e o pH, o qual determina as cargas das proteínas de acordo com seu pI.

Em pH acima do pI, as proteínas ficam carregadas negativamente e abaixo, positivamente. Em valores de pH distantes do pI, a proteína se liga fortemente ao trocador, e sua remoção da resina normalmente exige o uso de um tampão com alta força iônica durante a eluição. Em valores de pH próximos ao pI, a ligação é mais fraca, o que facilita a eluição. Vale observar que como as cargas na superfície da proteína são distribuídas assimetricamente, a ligação com a resina pode ocorrer mesmo a carga total da proteína é igual à do trocador de íons (JANSON, 1990).

Figura 5 - Esquema de ligação dos diferentes íons da amostra às cargas na resina de troca iônica

Devido ao efeito de Donnan (Figura 6), o pH na região próxima à matriz em resinas de troca catiônica usualmente é uma unidade menor do que o pH do meio e em resinas de troca aniônica, uma unidade maior. Esta variação no

pH deve ser observada para evitar a desnaturação da proteína de interesse ou a ligação demasiadamente intensa desta no trocador de íons.

Figura 6 - Variação do pH na superfície da matriz em decorrência do efeito Donnan. A) Resina de troca aniônica, pH próximo a matriz (pH_m) > pH do tampão (pH_t) pela afinidade com hidroxilas. B) Resina de troca aniônica, pH_m < pH_t

Fonte: Adaptado de Domènech et al., 2012.

Embora as proteínas possam ser eluídas por mudança do pH do meio, a remoção das proteínas ligadas na cromatografia de troca iônica é geralmente feita aumentando-se a força iônica do meio para deslocar as proteínas ligadas à resina e com isso elas são eluídas, sendo aquelas com menor densidade de carga removidas primeiro. A maioria das proteínas são eluídas com concentrações de sal menores do que 1 M. O tipo de íon utilizado pode influenciar na eluição e na resolução da cromatografia. Por exemplo, ânions polivalentes são melhores para deslocar moléculas pequenas de trocadores aniônicos do que os monovalentes. De maneira geral isso também se aplica às proteínas, mas há exceções, citrato (carga -3) é mais eficiente do que cloreto (carga -1) para deslocar ovalbumina de um trocador aniônico em pH 8,0, mas é menos eficiente para o inibidor de tripsina da soja (SCOPES, 1994).

2.6.5. Cromatografia de interação hidrofóbica

A cromatografia de interação hidrofóbica (HIC) é uma técnica de separação onde as proteínas, ou outros solutos, são adsorvidas em uma fase estacionária com grupo funcional hidrofóbico. A adsorção ocorre em presença de uma fase móvel com alta concentração de íons, como sulfato de amônio, que promove a interação de porções hidrofóbicas da proteína com a fase

estacionária. A eluição pode ser feita reduzindo a concentração de íons da fase móvel. Neste caso a eluição ocorre em ordem crescente de hidrofobicidade. Outras estratégias para a eluição de substâncias muito hidrofóbicas são: reduzir a polaridade do solvente pela adição de etilenoglicol, (iso)propanol ou detergentes que deslocam a proteína da resina (CREIGHTON, 1984). Estas estratégias podem ser combinadas para garantir que a proteína de interesse seja eluída. Como a adsorção das proteínas ocorre com alta concentração de íons, é vantajoso utilizar a HIC após cromatografias de troca iônica onde a proteína tenha sido eluída em alta força iônica, ou após etapas de precipitação com sulfato de amônio. Um cromatograma típico de uma HIC é apresentado na Figura 7.

Figura 7 - Eluição de uma HIC baseada num gradiente decrescente de sal. As proteínas são eluídas de acordo com sua hidrofobicidade

Fonte: CREIGHTON, 1984.

2.6.6. Cromatografia de Afinidade por Metais Imobilizados (IMAC)

A IMAC explora a capacidade de aminoácidos como histidina, triptofano e cisteína se ligarem a metais de transição. A força desta ligação varia de acordo com a quantidade destes aminoácidos na proteína em questão, o que muitas vezes confere alta especificidade a esta técnica. Nas resinas de IMAC, a matriz possui um espaçador hidrofílico acoplado a um agente quelante que

imobiliza os íons metálicos na fase estacionária. Dentre os agentes quelantes usados na IMAC, o ácido iminodiacético (IDA) é o mais utilizado. As matrizes mais utilizadas, por sua vez, são as de Sepharose (4B e 6B) ou Sephadex G100. O espaçador garante que o metal quelado esteja acessível para a ligação com as proteínas (KARMALI, 2001).

Algumas características importantes para realização da IMAC são:

- A exposição de certos aminoácidos (histidina, cisteína, triptofano) na superfície da proteína é necessária para que ocorra a ligação. No caso de ligação à histidina, devem haver pelo menos duas histidinas próximas para a adsorção na resina. O arranjo estérico da cadeia polipeptídica desempenha um papel importante na ligação ao metal. Assim, proteínas com propriedades semelhantes como carga, tamanho e composição de aminoácidos, mas com estruturas secundária e terciária distintas, podem ser separadas.
- A adsorção por interação iônica pode ser suprimida pelo uso e tampões com alta força iônica.
- A forma de eluição mais comum é através da adição de imidazol, um análogo estrutural da histidina. A eluição também pode ser realizada via gradiente de pH, adição de ligantes competitivos, agentes quelantes ou solventes orgânicos.
- A diminuição no pH pode levar à eluição das proteínas adsorvidas, pois em pH inferior a 5,3 os resíduos de histidina ficam protonados, condição na qual se desligam dos íons imobilizados.

A IMAC é largamente utilizada na purificação de proteínas recombinantes produzidas em fusão com cauda de histidina graças à sua grande seletividade (Figura 8).

Figura 8 - Ligação da histidina a Ni²⁺ imobilizado em IDA

Fonte: GENTAUR, 2009

2.6.7 Cromatografia mista

A cromatografia mista, ou multimodal, refere-se a um tipo de cromatografia líquida onde a fase estacionária e os solutos apresentam mais de uma forma de interação entre si. Embora interações secundárias entre a fase estacionária e os solventes sejam conhecidas há tempos, por muitos anos elas foram consideradas indesejadas por seu efeito na separação dos solutos ser difícil de prever. Contudo, nos últimos anos, a necessidade de melhorar a resolução e separação nas cromatografias líquidas levou ao estudo e desenvolvimento de novas resinas que se aproveitam destas interações secundárias e nos últimos anos o uso da cromatografia mista tem crescido bastante por apresentar características como alta resolução, alta seletividade e, em certas circunstâncias, a capacidade de substituir duas cromatografias tradicionais em um único passo (YANG et al., 2011).

Dentre os diferentes tipos de interações moleculares combinadas nas cromatografias mistas, os mais comuns são a troca iônica, ligação de hidrogênio e interação hidrofóbica.

As resinas multimodais comerciais, como Capto-MMC (com carga negativa) e Capto Adhere (com carga positiva) (Figura 9), contêm ligantes com resíduos aromáticos e grupos de ligação ao hidrogênio próximos a grupos iônicos, o que permite a adsorção de proteínas em alta concentração de sal. Contudo, a eluição das proteínas da MMC normalmente requer tanto a

variação do pH como da concentração de sal e da composição química do eluente, em contraste com a eluição de proteínas em outras cromatografias de troca iônica, que normalmente é feita variando somente um destes parâmetros (BRAMBURE et al., 2013 e KALEAS et al., 2010).

Figura 9 - Ligante da resina Capto-MMC

Fonte: GE LIFESCIENCE, 2013

A escolha da sequência adequada de cromatografias, precipitações e outras etapas é essencial para o sucesso da purificação da proteína de interesse. As cromatografias devem ser concatenadas de modo que as condições de eluição de uma etapa sejam adequadas para a aplicação da proteína de interesse na próxima resina no que diz respeito ao pH, volume de amostra, força iônica, presença de solventes e concentração de impurezas, por exemplo. Desta forma pode-se tirar o máximo de proveito de cada etapa cromatográfica reduzindo a perda de produto, o volume de soluções e o tempo despendidos em cada etapa do processo.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Desenvolver um processo de purificação para obter a proteína PspA4Pro, produzida por cultivo de *E. coli* recombinante, com pureza superior a 95% com relação às demais proteínas, para uso em vacinas pneumocócicas tanto de proteínas puras como conjugadas a polissacarídeos.

3.2 Específicos

- Estudar a precipitação de proteínas contaminantes em pH ácido e com o detergente catiônico brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) nas etapas iniciais do processo de purificação.
- Determinar as condições de adsorção e eluição para as cromatografias de troca iônica, interação hidrofóbica, afinidade por metais, cromatografia mista (troca iônica/hidrofobicidade).
- Avaliar a estrutura e a estabilidade da PspA4Pro após o processo de purificação.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Material de partida

Foram realizados sete processos de purificação de PspA4Pro produzida em quatro cultivos distintos (Tabela 3). Devido às características antigênicas, o fragmento de PspA do clado 4 clonado contém a porção N-terminal, a região definidora de clado e a primeira parte da região rica em prolina da molécula (PspA4Pro) e foi desenvolvido pela equipe da Dra. Eliane N. Miyajiri, que gentilmente cedeu a cepa de *E. coli* transformada para a realização deste trabalho (MORENO et al., 2010). A proteína foi produzida na forma solúvel em *E. coli* BL21(DE3) empregando o plasmídeo pET37b+ sem cauda de histidinas.

Os cultivos foram realizados em reator de 5 litros pela equipe da Profa. Dra. Teresa Cristina Zangirolami, do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos. Os cultivos foram centrifugados e o pellet foi congelado a -80 °C e enviado para o Instituto Butantan nas condições adequadas. A Tabela 3 resume as condições dos cultivos onde a PspA4Pro foi produzida.

Tabela 3 - Cultivos realizados para produção e purificação de PspA4Pro

Cultivo	Condições do cultivo	Operador	Processo de purificação
1	Meio definido. Indução c/ lactose a 30 °C. Cx=98g/L	Antonio C. L. Horta	nº 1, 5 e 6
2	Meio definido c/ suplementação de aminoácidos. Indução c/ lactose a 30 °C. Cx=111g/L	Gilson Campani Jr.	nº 2
3	Meio autoindução c/ hidrolisado de proteína de soja, pulso de glicerol e lactose a 31 °C. Cx=60g/L	Mauricio Possedente dos Santos	nº 3
4	Meio autoindução c/ hidrolisado de proteína de soja a 25 °C. Cx=45g/L	Mauricio Possedente dos Santos	nº 4 e 7

4.2 Quantificação de proteínas totais e determinação da pureza da PspA4Pro

O método de Lowry foi utilizado para verificar a concentração de proteínas empregando albumina do soro bovino (BSA) como padrão (LOWRY et al., 1951).

A pureza relativa foi determinada por densitometria dos géis de SDS-PAGE a 12% contendo 2-mercaptoetanol (LAEMMLI, 1970), em um aparelho de eletroforese EPS 601 (Pharmacia). As corridas foram realizadas a 120 V, 190 mA e 100 W por aproximadamente 1,5 h. A pureza foi calculada como a porcentagem da banda correspondente à PspA4Pro em relação à soma das densidades de todas as demais bandas na respectiva canleta do gel. As densidades destas bandas foram medidas em um densitômetro Bio-Rad GS-800. O *Western Blot* foi realizado de acordo com Miyaji et al., 2002. O soro anti-PspA do clado 4 foi cedido pela Dra. Eliane Miyaji. Para a obtenção deste soro foi construído um clone de *S. pneumoniae* da cepa acapsulada Rx1 recombinante expressando PspA4. As proteínas ligantes de colina foram recuperadas pela incubação desta cepa com 2% de cloreto de colina e o sobrenadante foi utilizado para imunização dos camundongos BALB/c. Como anticorpo secundário foi empregado antissoro de camundongo produzido em cabra conjugado à peroxidase. A revelação foi feita com diaminobenzidina (DAB), CoCl_2 e H_2O_2 .

4.3 Estratégia de purificação

A ordem das operações unitárias definida para o processo de purificação foi a seguinte: homogeneização, para extrair a PspA4Pro intracelular, clarificação sob diferentes condições de pH e concentrações de CTAB para remover debris celulares e reduzir a carga de contaminantes antes da aplicação à coluna cromatografica, cromatografia de troca aniônica ou multimodal, ajuste de pH para aplicação a resina cromatográfica e crioprecipitação, cromatografia de troca catiônica ou multimodal e cromatografia hidrofóbica, de afinidade por metais ou novamente multimodal, sendo as duas ultimas etapas cromatográficas etapas de polimento para atingir a pureza requerida (Figura 10).

Figura 10 - Diagrama de fluxo das estratégias de purificação testadas para PsA4Pro proveniente de diferentes cultivos. Os quadros vermelhos representam as diferentes técnicas testadas em cada etapa do processo de purificação.

4.4 Ruptura celular

Os pellets congelados dos cultivos descritos na Tabela 3 foram ressuspensos em tampão de lise, cuja composição é: tampão NaH_2PO_4 1mM pH6,5 + EDTA 2,5 mM com 0,1%(p/v) do detergente neutro Triton X-100 e 1mM do inibidor de proteases Fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), na proporção de 1 litro de para aproximadamente cada 100 g de pellet. A ressuspensão foi realizada a cerca de 4 °C, utilizando um homogeneizador de pás a 11.000 rpm do modelo X-520 (Ingenieurbüro CAT M. Zipperer GmbH), até não haver mais grumos visíveis. Esta suspensão bacteriana foi colocada em um funil encamisado acoplado ao homogeneizador contínuo de alta pressão (APV GAULIN) com a saída também refrigerada por meio de um trocador de calor do tipo casco e tubo (Figura 11). A temperatura do refrigerante foi de 4°C e a pressão de trabalho foi de 500bar com fluxo de amostra de 1L/min. A amostra foi recirculada em *loop* fechado até todo o volume passar pelo menos seis vezes pelo homogeneizador e ao final foi empurrada com de tampão de lise entre 500 mL e 1000 mL, resultando em proporção final de 1,5 a 2 L de tampão para aproximadamente cada 100 g de massa celular úmida. A fração recolhida do homogeneizador foi nomeada Homogenato.

Figura 11 - Sistema para ruptura celular. 1) Homogeneizador contínuo de alta pressão APV GAULIN; 2) Trocador de calor casco e tubo; 3) Funil encamisado. 4) Recirculador de fluido de refrigeração

4.5 Clarificação

Centrifugação foi o método de escolha para remover os debrís celulares do Homogenato, permitindo sua aplicação às resinas cromatográficas.

As seguintes condições de clarificação do Homogenato foram testadas:

- 1) Clarificação em pH6,5, para remoção de debrís celulares, permitindo que a amostra seja aplicada na resina de troca aniônica.
- 2) Clarificação em pH4,0, pois este pH permitiria aplicar a PspA4Pro na resina de troca catiônica diretamente após a clarificação (pI PspA4Pro = 4,8).
- 3) Clarificação em pH5,5, foi testada para aplicação da amostra em resina mista hidrofóbica e de troca catiônica.
- 4) A clarificação com adição do detergente CTAB, foi testada para auxiliar a remoção de restos celulares e proteger as resinas cromatográficas (Asenjo, 1990). O detergente foi adicionado ao Homogenato, sob agitação, até a concentração escolhida e a suspensão permaneceu sob agitação por 90 min antes de ser centrifugada.

Após os tratamentos descritos acima, as amostras foram centrifugadas (17696 g, 120 min, 4 °C) e o sobrenadante, chamado Clarificado, seguiu para as etapas cromatográficas.

4.5.1 Determinação da concentração de CTAB a ser empregada na clarificação

Para determinar a concentração de CTAB a ser utilizada na clarificação, diversos testes foram realizados nos diferentes processos de purificação. No processo nº 2 somente uma concentração, 0,5% CTAB, foi avaliada. Nas purificações nº 3 a 6 amostras de 10 mL foram recolhidas em tubos de 15 mL para avaliação de diferentes concentrações de CTAB (0,05%, 0,01%, 0,15%, 0,20%, 0,25%, 0,30%, 0,35%, 0,4% e 0,5%). Para chegar a estas concentrações, partiu-se de uma solução de CTAB 10%. Após a adição do CTAB, as amostras foram agitadas em uma Mesa Agitadora TE-140 (TECNAL) a 60 rpm por 90 min à temperatura ambiente e centrifugadas (11600 g, 10 min, 24 °C). Na purificação nº7 este teste foi realizado com concentrações de 0,05% até 0,3%.

A concentração de CTAB escolhida para ser aplicada ao Homogenato foi a maior concentração na qual o sobrenadante estivesse translúcido, uma vez

que um sobrenadante totalmente transparente indicaria a precipitação da maioria das proteínas da amostra, incluindo a PspA4Pro. As exceções foram a purificação nº4, onde foi aplicada a mesma concentração de CTAB da purificação nº3, e a purificação nº6, onde a concentração de CTAB foi calculada com base nos resultados da purificação nº5, uma vez que ambas empregaram o mesmo material de partida. Assim, o volume de CTAB adicionada ao Homogenato da purificação nº6 foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$X = \frac{A_{280} \times V_H}{V_{CTAB}}$$

Onde X é a razão entre a quantidade de proteína no Homogenato medida como A280 e o volume de CTAB adicionado ao Homogenato da purificação nº5, A280 é a medida da absorbância 280nm do Homogenato da purificação nº5, V_H é o volume do Homogenato da purificação nº5 e V_{CTAB} é o volume de CTAB adicionado ao Homogenato da purificação nº5.

A cada processo novos experimentos foram idealizados na tentativa de encontrar um parâmetro de avaliação mais preciso para a concentração de CTAB do que a transparência e cujo resultado pudesse ser obtido em pouco tempo, já que a clarificação deve ser realizada rapidamente após a ruptura celular. Assim, além da transparência nos sobrenadantes das amostras precipitadas com CTAB, foram medidas a pureza de PspA4Pro (purificações nº3, nº4 e nº7), a concentração de proteínas totais (purificações nº4 e 7), a condutividade (condutivímetro AJMicronal AJX-522) e a viscosidade (viscosímetro Brookfield DVII+Pro) (purificação nº5), DO600, A280, massa de altura do pellet após a centrifugação (purificação nº7). Os tubos onde as precipitações foram realizadas foram pesados (balança analítica Shimadzu AUW220D) antes da adição da amostra e depois da centrifugação para que a massa dos pellets fosse determinada. A altura dos pellets após a centrifugação foi determinada desde a base do tubo até o ponto mais alto alcançado pelo pellet na lateral do tubo.

4.6 Cromatografia de troca aniônica em Q-Sepharose

As cromatografias de troca aniônica foram realizadas em resina Q-Sepharose Fast Flow empacotada em coluna XK 50/30 (diâmetro ($\varnothing$) = 50 mm

e altura do leito cromatográfico (L_c) = 13 cm) acoplada a um cromatógrafo Äkta Explorer, Biopilot ou Äkta Avant (GE Lifescience) (Figura 12).

Figura 12 - Äkta Avant utilizado nos processos cromatográficos executados

O volume de coluna (VC) foi de 250 mL e o fluxo de trabalho foi de 50 mL/min. A resina foi equilibrada com 5 VC de uma solução de fosfato de sódio 10 mM pH6,5 (condutividade de 1,2 mS/cm) e reequilibrada com 5 VC da mesma solução após a aplicação da amostra. As amostras aplicadas à resina tiveram o pH ajustado para 6,5 e a condutividade para aproximadamente 1,5 mS/cm. Após a aplicação da amostra realizou-se uma lavagem com fosfato-Na 15 mM pH6,5 com 100 mM NaCl. A eluição foi feita com gradiente descontínuo e crescente de NaCl: 300 mM, 500 mM e 1000 mM em tampão fosfato-Na 15 mM pH6,5, sempre com 5 VC para cada fração. A resina foi regenerada com 3 VC de solução de NaOH 100 mM. A fração não adsorvida foi chamada F1Q e as frações eluídas foram chamadas de Qx (onde x = concentração de NaCl na eluição em mM).

4.7 Crioprecipitação pH4,0

A proteína deve estar com carga positiva antes de ser aplicada à resina de troca catiônica. Por este motivo, a fração eluída da Q-sepharose teve seu pH reduzido para 4,0 com ácido acético glacial. A amostra foi centrifugada (17696g, 120 min, 4 °C) e o sobrenadante foi congelado (-20 °C) por pelo menos 24 horas. A amostra foi descongelada e centrifugada novamente (mesmas condições) para remover material precipitado e o sobrenadante,

denominado Crio-pH4,0, foi aplicado na resina SP-Sepahrose ou Capto-MMC. Alternativamente, foi também testada a crioprecipitação em pH5,5 para aplicação na Capto-MMC.

4.8 Cromatografia de troca catiônica em SP-Sepharose

As cromatografias de troca catiônica foram realizadas com resina SP-Sepharose 6 Fast Flow empacotada em coluna XK 26/20 ($\varnothing$ = 26 mm Lc= 14 cm). O sistema de controle da cromatografia foi o mesmo utilizado na Q-Sepharose. O VC foi de 75 mL e o fluxo de trabalho foi de 12 mL/min. As amostras aplicadas à resina tiveram a condutividade ajustada para aproximadamente 35 mS/cm com água destilada e o pH reajustado para 4,0 com ácido acético glacial. A resina foi equilibrada com 5 VC de uma solução de acetato-Na 25 mM + NaCl 300 mM pH4,0 (35 mS/cm) e reequilibrada com 5 VC da mesma solução após a aplicação da amostra. A eluição foi feita com gradiente descontínuo e crescente de NaCl: 500 mM e 1000 mM em acetato-Na 25 mM pH4,0. Ao final do processo foi feita a limpeza com 1000 mM NaCl em acetato-Na 25 mM pH6,5. A regeneração foi feita com 3 VC de uma solução de NaOH 100 mM.

Uma variação deste método foi avaliada nos processos de purificação nº 5 e 6 feitos a partir do Cultivo nº 1, e da purificação nº7, feita a partir do Cultivo nº 4. Nestes processos o equilíbrio foi feito com 5 VC de uma solução de acetato-Na 25 mM pH4,0 sem a adição de NaCl e as amostras foram diluídas em água destilada até atingirem o volume de 2 L e força iônica de aproximadamente 20 mS/cm. As eluições foram feitas tal como descrito anteriormente.

4.9 Cromatografia hidrofóbica em Fenil-Sepharose

A resina Phenyl-Sepharose 6 Fast Flow foi empacotada em uma coluna XK 50/20 com volume de resina igual a 150 mL ($\varnothing$ = 50 mm; Lc = 7,6 cm). O fluxo de trabalho 25 mL/min. O equilíbrio da resina foi feito com 5 VC de uma solução de fosfato-Na 10 mM com sulfato de amônio 1 M, pH7,0. Antes de ser aplicada à resina a amostra foi ajustada para pH7,0 e sulfato de amônio foi adicionado até a concentração de 1 M. Após a aplicação da amostra, a resina

foi lavada com 5 VC da mesma solução. A eluição foi feita com 5 VC de um gradiente descontínuo e decrescente de sulfato de amônio: 750 mM, 500 mM, 250 mM e 0 mM em tampão fosfato de sódio 10 mM pH7,5. A resina foi regenerada com 3 VC de uma solução de ureia 4 M + NaOH 1 M.

4.10 Cromatografia de afinidade por metais em IMAC-Níquel

A resina IMAC, de afinidade por metais, foi empacotada em uma coluna XK50/30 com volume de coluna igual a 200 mL ($\varnothing$ = 50 mm Lc = 13 cm) e carregada com uma solução de sulfato de níquel 200 mM. O fluxo de trabalho foi de 50 mL/min. O equilíbrio da resina foi feito com 5 VC de uma solução de fosfato de sódio 10 mM + NaCl 300 mM pH8,0 (35 mS/cm) e 5 VC da mesma solução foi usada para lavar a coluna após a aplicação da amostra. Antes da aplicação a amostra foi ajustada para as mesmas condições de pH e condutividade do tampão de equilíbrio. Como era esperado que a proteína saísse da coluna na fração não adsorvida, uma vez que não apresenta cauda de histidina, não foi feita a eluição com imidazol, como é usual para este tipo de cromatografia. Em vez disso, empregou-se 5 VC de uma solução de EDTA 200 mM para remover o níquel e qualquer contaminante e regenerar a resina.

4.11 Cromatografia mista Capto-MMC

A resina Capto-MMC foi empacotada em uma coluna XK 26/20 com volume de coluna de 25 mL ($\varnothing$ = 26 mm; Lc = 4,7 cm). O fluxo de trabalho foi de 4 mL/min. Diferentes condições de equilíbrio e eluição foram avaliadas.

No processo de purificação nº 3 realizado a partir do Cultivo 3, avaliou-se equilíbrio com 5 VC de uma solução acetato-Na 15 mM + NaCl 650 mM pH6,5 (65 mS/cm). A eluição foi feita com 5 VC de um gradiente descontínuo e crescente de L-arginina (KALEAS et al., 2010) em acetato-Na 25 mM pH6,5 em quatro concentrações diferentes: 250 mM, 500 mM e 750 mM e 1000 mM. A limpeza foi feita com 3 VC de uma solução L-arginina 1 M em fosfato-Na 25 mM + NaCl 1 M pH8,0.

No processo de purificação nº 4 feito a partir do Cultivo 4 foram avaliadas três diferentes condições para a Capto-MMC. Na primeira, realizada após a clarificação, o equilíbrio foi feito com 5 VC de tampão fosfato de sódio 10 mM

pH6,5 (1,5 mS/cm). Na segunda, realizada após a Crioprecipitação pH4,0, o equilíbrio foi feito com 5 VC de tampão acetato-Na 25 mM + NaCl 300 mM pH4,0 (35 mS/cm). Nestas duas condições a eluição foi feita com 5 VC de um gradiente descontínuo e crescente de L-arginina, 100 mM, 200 mM, 300 mM, 400 mM, 500 mM e 1000 mM, em acetato-Na 25 mM pH6,5. A limpeza foi feita como no processo de purificação nº 3. Na terceira condição avaliada, realizada após a SP-Sepharose, o equilíbrio foi feito com 5 VC de tampão acetato-Na 15 mM pH6,5 e condutividade 29 mS/cm. A amostra foi aplicada com condutividade igual a 30 mS/cm. A eluição foi feita com 5 VC de um gradiente descontínuo e crescente de L-arginina em acetato-Na pH6,5 em quatro concentrações diferentes: 250 mM, 500 mM e 750 mM e 1000 mM e a limpeza como processo de purificação nº 3.

No processo de purificação nº 5 realizado a partir do Cultivo 1 foram feitos dois testes com a Capto-MMC. No primeiro, realizado após a clarificação, o equilíbrio foi feito com 5 VC de tampão fosfato de sódio 10 mM pH6,5 e condutividade 1,5 mS/cm. No segundo, realizado após a Crioprecipitação pH4,0, o equilíbrio foi feito com 5 VC de tampão acetato-Na 25 mM + NaCl 300 mM pH4,0 e condutividade 40 mS/cm. Nestes dois testes a eluição foi feita com 5 VC de um gradiente descontínuo e crescente de L-arginina em acetato-Na 25 mM pH6,5 em cinco concentrações diferentes: 100 mM, 200 mM, 300 mM, 500 mM e 1000 mM.

No processo de purificação nº 6 também foram avaliadas duas condições para a Capto-MMC. Na primeira, realizada após a clarificação em pH5,5, o equilíbrio foi feito com 5 VC de solução acetato de sódio 10 mM pH5,5 (condutividade 1,5 mS/cm). A eluição foi feita com um gradiente descontínuo e crescente de L-arginina em acetato-Na 25 mM pH5,5 em quatro concentrações diferentes: 100 mM, 300 mM, 500 mM e 1000 mM. Na segunda condição, realizada após Crioprecipitação em pH5,5, o equilíbrio foi feito com 5 VC de tampão acetato-Na 25 mM + NaCl 300 mM pH5,5 (condutividade 42 mS/cm). A eluição foi feita com 5 VC de um gradiente descontínuo e crescente de L-arginina em acetato-Na 25 mM pH5,5 em quatro concentrações diferentes: 100 mM, 300 mM, 500 mM e 1000 mM. Além disso, foi feita uma eluição final com 800 mM L-arginina em acetato-Na 25 mM pH6,5 + 1M NaCl.

4.12 Parâmetros de avaliação dos processos cromatográficos.

Os parâmetros de proteína total, quantidade e pureza de PspA4Pro, recuperação de PspA4Pro geral e por etapa, fator de purificação geral e por etapa, além de eficiência do processo de purificação, foram usados na construção de tabelas de purificação para avaliar e orientar os processos de purificação. Estes parâmetros foram calculados da seguinte maneira:

- Proteína total, P (g):

$$P = Cp \times V$$

Sendo Cp a concentração de proteínas (g/mL) e V o volume da fração (mL)

- Pureza PspA4Pro (%): Dada pela porcentagem da banda de PspA4Pro no SDS-PAGE medida por densitometria.
- Quantidade de PspA4Pro(g):

$$PspA4Pro(g) = \frac{P(g) \times Pureza\ PspA4Pro(\%)}{100}$$

- Recuperação geral de PspA4Pro, Rcg (%):

$$Rcg(\%) = \frac{PspA4Pro(g)_n \times 100}{PspA4Pro(g)_h}$$

Sendo PspA4Pro(g)n a quantidade de PspA4Pro na etapa em questão e PspA4Pro(g)h a quantidade de PspA4Pro no Homogenato.

- Recuperação por etapa de PspA4Pro, Rce(%):

$$Rce(\%) = \frac{PspA4Pro(g)_n \times 100}{PspA4Pro(g)_{n-1}}$$

Sendo PspA4Pro(g)_{n-1} a quantidade de PspA4Pro na etapa anterior

- Fator de purificação geral, FPg:

$$FPg = \frac{PspA4Pro(\%)_n}{PspA4Pro(\%)_h}$$

Sendo PspA4Pro(%)n a pureza da PspA4Pro na etapa em questão e PspA4Pro(%)h a pureza no Homogenato.

- Fator de purificação por etapa, FPe:

$$FPe = \frac{PspA4Pro(\%)_n}{PspA4Pro(\%)_{n-1}}$$

- Eficiência do processo de purificação, EPP:

$$EPP = \frac{FPg \times Rcg}{N}$$

Sendo N o número de etapas do processo.

4.13 Atividade da PspA4Pro após a purificação

A atividade da PspA4Pro foi verificada por teste de ligação à lactoferrina de leite humano (SIGMA-ALDRICH, cat nº L0520). A lactoferrina liofilizada foi ressuspensa em água destilada na concentração de 1mg/mL e esta solução foi aplicada às amostras de PspA4Pro, 4 mg/mL, purificada no próprio laboratório (pureza > 95%) em três diferentes proporções de modo a obter-se as seguintes quantidades: 2 mg de PspA4Pro + 0,5 mg de lactoferrina, 1mg de PspA4Pro + 1mg de lactoferrina e 1mg de PspA4Pro + 2 mg de lactoferrina. As amostras foram incubadas a 37 °C por 1 hora para que ocorresse a ligação das duas proteínas e aplicadas em uma coluna de gel filtração TSK-GEL G2000SW_{XL} (TOSOH BIOSCIENCE) acoplada a um equipamento para cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) SCL-10AVP (SHIMADZU). A fase móvel utilizada fosfato de sódio 300 mM com 500 mM NaCl, pH7,0, o fluxo de trabalho de 0,6 mL/min e detector de UV280nm.

4.14 Determinação da massa molecular da PspA4Pro por CLAE

A massa molecular da PspA4Pro foi determinada através do tempo de retenção do fragmento da proteína purificada na mesma coluna de gel filtração e mesmo equipamento para CLAE utilizados para avaliação da atividade. A fase móvel utilizada foi fosfato de sódio 10 mM pH7,0 com 200 mM NaCl e o fluxo de trabalho foi de 0,6 mL/min. Duas curvas padrão de tempo de retenção por massa molecular foram empregadas para o cálculo, uma feita com proteínas globulares: β-amilase (220kDa), albumina (66kDa), anidrase carbônica (30kDa), citocromo C (12kDa) e aprotinina (6kDa); e outra feita com

polímeros lineares de dextrana de massas moleculares de 6kDa, 10kDa, 70kDa e 229kDa.

4.15 Estrutura secundária e estabilidade térmica e ao pH da PspA4Pro purificada

A estrutura secundária, estabilidade térmica e à variação de pH foram verificadas via dicroísmo circular, gentilmente realizado pelo Dr. Eneas de Carvalho, do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan. Para tanto, amostras da proteína purificada foram preparadas nas seguintes condições: uma amostra em tampão fosfato de sódio 10 mM pH7,0, uma amostra em tampão fosfato de sódio 10 mM mais 0,15% CTAB, ambas com 0,1mg/mL de PspA4Pro. Para o experimento de estabilidade ao pH foram preparadas amostras de 0,1mg/mL de PspA4Pro purificada, em fosfato de sódio 10 mM em pHs entre 3,5 até 9,0. A deconvolução da proteína foi realizada utilizando o banco de dados online Dichroweb (WHITMORE et al., 2004) o algoritmo Contin (VAN STOLLUN et al., 1990).

4.16 Remoção de endotoxina

A endotoxina ainda presente na PspA4Pro purificada foi removida utilizando um kit de remoção de endotoxina (Pierce Thermo Science) contendo 1mL de resina de poli- ϵ -L-lisina em um tubo falcon de 10 mL. A concentração final de endotoxina foi medida por teste de *Limulus Amebocyte lysate* (LAL) (BANG, 1956), gentilmente realizado pela Dra. Bianca Pereira Carvalho, pela Seção de Vacina Aeróbicas do Instituto Butantan.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Processo de purificação nº1 (Cultivo 1)

O processo de purificação nº1 partiu da biomassa congelada do cultivo nº1. Após a ruptura da biomassa no homogeneizador contínuo de alta pressão, parte do Homogenato foi centrifugado em pH4,0 e parte em pH6,0, na etapa chamada de clarificação. O Clarificado em pH6,5 seguiu para a cromatografia de troca aniônica em Q-Sepharose. A PspA4Pro eluída teve seu pH ajustado para 4,0, foi congelada *overnight* e centrifugada para aplicação na resina de troca catiônica SP-Sepharose. A última etapa do processo foi a cromatografia hidrofóbica na Fenil-Sepharose (Figura 13).

Figura 13 - Sequência de operações realizadas durante o processo de purificação nº1

A Figura 14 descreve queda da densidade ótica no comprimento de onda de 600nm (DO600), que indica a redução na concentração de células íntegras no meio, e o aumento da absorbância da luz ultravioleta a 280nm (A280), que indica a liberação de proteínas solúveis das células para o meio durante a ruptura celular da biomassa no processo de purificação nº1. Observa-se que aos quatro minutos a extração de proteínas e a ruptura celular atingiram o equilíbrio, indicando que este é o tempo mínimo que a biomassa deve permanecer no homogeneizador, nas condições descritas, para que a ruptura seja completa.

Figura 14 - Acompanhamento da ruptura celular e extração de proteínas no processo de purificação nº1

Na Figura 15 pode-se comparar a pureza e a recuperação da PspA4Pro na fração Clarificado pH6,5, ou seja, no sobrenadante obtido após centrifugação do Homogenato ajustado a pH 6,5, com a pureza e a recuperação no sobrenadante após centrifugação do Homogenato ajustado a pH4,0 (Clarificado pH4,0).

Figura 15 - Avaliação da clarificação em pH6,5 e pH4,0

A clarificação em pH6,5 teve recuperação de 92,1% da PspA4Pro em relação ao Homogenato. A clarificação em pH6,5 foi necessária pois os restos celulares presentes no Homogenato impedem a sua aplicação nas resinas cromatográficas e devem ser removidos. A pureza da PspA4Pro passou de 16,3% no Homogenato para 16,8% no Clarificado pH6,5 (FP=1,03). Na medida

em que o pH do Homogenato foi reduzido, observou-se a formação de grande quantidade de precipitado e a clarificação em pH4,0 mostrou-se inadequada, apresentando baixa recuperação da PspA4Pro no sobrenadante, apenas 3,9%. Ademais, a proteína recuperada no sobrenadante apresentou pureza muito inferior à inicial (3,1% contra 16,3%). A perda de PspA4Pro nesta etapa pode ser devido à precipitação isoelétrica, já que pH4,0 está próximo ao *pI* da proteína, ou ao arraste da PspA4Pro junto a precipitação de impurezas.

A Tabela 4 e a Figura 16 mostram os resultados de cada uma das frações onde a PspA4Pro foi recuperada durante o processo de purificação nº1.

Tabela 4 - Tabela de purificação do processo nº1

Fração	Pureza PspA4Pro (%)	PspA4Pro total (g)	Recuperação geral PspA4Pro (%)	Recuperação por etapa PspA4Pro (%)	Fator de Purificação geral	Fator de Purificação por etapa
Homogenato	16,3	2,8	100,0	100,0	1	1
Clarificado pH6,5	16,8	2,6	92,1	92,1	1,03	1,03
Q 300 mM	55,4	2,6	93,2	100,0	3,4	3,3
Crio-pH4,0	75,9	1,2	44,1	47,3	4,7	1,4
SP 1000mM	84,3	1,2	43,9	100,0	5,2	1,1
Fenil 750mM	86,8	0,1	5,0	11,5	5,3	1,03
Fenil 500mM	82,8	0,2	7,8	17,8	5,1	0,95

Figura 16 - Pureza e recuperação de PspA4Pro nas frações do processo nº1

O processo de purificação nº 1 não levou à obtenção da PspA4Pro com pureza >95%. O maior aumento da pureza aconteceu na cromatografia em Q-Sepharose, que também apresentou boa recuperação da PspA4Pro. Contudo, mais de 50% da proteína recuperada nesta etapa foi perdida durante a crioprecipitação em pH4,0. Embora a perda de PspA4Pro nesta etapa tenha sido grande, a crioprecipitação em pH4,0 teve uma recuperação muito maior do que a clarificação a pH4,0 do Homogenato, 47,3% na fração Crio pH4,0 contra 3,9% no Clarificado pH4,0. Isso sugere que não estaria ocorrendo precipitação da PspA4Pro, não se tratando, portanto, de uma precipitação isoelétrica. Se este fosse o caso, a recuperação deveria ser semelhante nas duas precipitações. A perda de PspA4Pro poderia ser devida a moléculas contaminantes que arrastariam a PspA4Pro junto com elas ao precipitarem a pH 4,0. De fato, a PspA4Pro com pureza superior a 95%, oriunda de purificações posteriores (item 5.5), teve seu pH ajustado entre pH3,5 e pH9,0 sem que se observasse precipitação da proteína em nenhum dos pH.

O ponto isoelétrico predito da PspA4Pro é igual a 4,8, o que significa que o pH da solução deve estar por volta de uma unidade abaixo deste valor para aplicação na SP-Sepharose, que adsorve moléculas com carga positiva. Assim,

apesar da perda de PspA4Pro, é necessário acidificar o pH da eluição da Q-Sepharose para a etapa seguinte do processo de purificação.

Dentre as etapas cromatográficas, a hidrofóbica foi aquela com menores recuperação de PspA4Pro e fator de purificação. A proteína eluiu em duas concentrações distintas do gradiente (750 mM e 500 mM), e em nenhuma delas atingiu a pureza requerida. Experimentos realizados anteriormente no laboratório já sugeriam que a cromatografia hidrofóbica não era eficiente para a purificação de outras PspA (CARVALHO, 2009), e este experimento corroborou aqueles dados. Desta forma esta etapa foi eliminada dos processos seguintes.

A Figura 17 mostra o SDS-PAGE das frações de cada etapa da purificação onde a PspA4Pro foi recuperada, deixando claro a presença de quantidade considerável de contaminantes ao final do processo, indicada pelas bandas visíveis abaixo da banda da PspA4Pro eluída da Fenil Sepharose e a Figura 18 resume as conclusões feitas a partir dos resultados das diferentes operações realizadas durante a purificação nº1.

Figura 17 - Compilação dos SDS-PAGE da purificação nº1. A) Padrão de peso molecular. B) Homogenato. C) Clarificado pH6,5. D) Q300. E) Crioprecipitado pH4,0. F) Sp1000. G) Fenil 750A

Figura 18 - Etapas eliminadas, etapas mantidas e conclusões retiradas dos resultados do processo de purificação nº1

5.2 Processo de purificação nº2 (Cultivo 2)

A Figura 19 descreve as operações realizadas durante o processo de purificação nº2, onde foram estudadas diferentes condições de clarificação e a aplicação de uma cromatografia negativa de afinidade por metais como etapa de polimento do processo. Após a clarificação a amostra seguiu para as etapas cromatográficas, Q-Sepharose e em SP-Sepharose, intermediadas pela crioprecipitação em pH4,0. A etapa final do processo foi uma cromatografia de afinidade por metais.

Figura 19 - Sequência de operações realizadas durante o processo de purificação nº2

A Figura 20 mostra a ruptura celular e a liberação de proteínas durante a passagem da biomassa pelo homogeneizador contínuo de alta pressão no início do processo de purificação nº2. Neste experimento, a medida inicial da DO600 estava muito baixa quando comparada àquela dos demais processos, e a A280 estava estabilizada desde sua medição inicial, indicando que as proteínas já estavam liberadas no meio. Embora o homogeneizador esteja acoplado a um trocador de calor, observou-se aumento de 12 °C na temperatura da amostra ao longo da ruptura celular. Contudo, uma vez que a temperatura se manteve abaixo dos 20 °C e a PspA4Pro mostrou-se estável a temperatura ambiente (item 5.12), não houve risco de degradação da mesma.

Figura 20 - Acompanhamento da ruptura celular, extração de proteínas e temperatura no processo de purificação nº2.

Na Figura 21 pode-se comparar a pureza e a recuperação da PspA4Pro após os testes de precipitação nas etapas iniciais do processo de purificação. Novamente a clarificação a pH4,0 apresentou grande perda de PspA4Pro e baixa purificação, confirmando o resultado observado no processo nº1. Uma vez que o pH não pôde ser acidificado abaixo do pI da PspA4Pro, a resina de troca catiônica não pôde ser empregada como primeira etapa cromatográfica do processo. A clarificação com CTAB a 0,5%, por outro lado, elevou a pureza de 42%, no Homogenato, para 80% no Clarificado CTAB 0,5%, com recuperação de 66,5%. A clarificação a pH6,5 elevou a pureza de 42% para 46% com recuperação de 54%. Nos testes com pH4,0 e CTAB 0,5% realizados após a clarificação a pH6,5 observou-se resultados semelhantes aos obtidos com o Homogenato, ou seja, o pH4,0 levou a perda de quase toda a PspA4Pro no precipitado (recuperação de 7% no sobrenadante) e o CTAB elevou a pureza para 77%, com recuperação de 60% no sobrenadante em relação ao Clarificado pH6,5. Embora os resultados tenham sido semelhantes, é mais vantajoso aplicar o CTAB ao Homogenato, onde a recuperação e a purificação foram melhores do que no Clarificado. Além disso, adicionar o CTAB ao Homogenato em vez do Clarificado elimina uma etapa de centrifugação, diminuindo o custo e o tempo do processo.

Figura 21 - Pureza e recuperação de PspA4Pro após precipitações com CTAB e diferentes pH nas etapas iniciais do processo de purificação nº2.

Diferente do processo nº1, neste processo ocorreu perda de 46,6% de PspA4Pro na etapa de clarificação em pH6,5 e na Q-Sepharose a proteína foi eluída em duas frações diferentes: Q100, ou seja, com NaCl 100 mM e Q300, com NaCl 300 mM (Tabela 5 e Figura 22). Levantou-se a hipótese de que a perda na clarificação poderia ser devida à formação de corpos de inclusão da PspA4Pro durante a síntese da proteína na *E. coli*, já que estes agregados são insolúveis e seriam removidos na centrifugação. De fato, foi verificada a presença da banda de PspA4Pro na fração insolúvel da clarificação em pH6,5, o que não ocorreu na clarificação em pH6,5 da purificação nº1. A presença de corpos de inclusão também explicaria a eluição atípica na Q-Sepharose, onde PspA4Pro com conformação incorreta teria se ligado mais fracamente à resina, sendo eluída com concentração de NaCl menor do que aquela observada no processo anterior.

Tabela 5 - Tabela de purificação do processo nº 2

Fração	Pureza PspA4Pro (%)	PspA4 Pro total (g)	Recuperação geral PspA4Pro (%)	Recuperação por etapa PspA4Pro (%)	Fator de Purificação Geral (Veze)	Fator de Purificação por etapa (Veze)
Homogenato	42,7	5,7	100,0	100,0	1,0	1,0
Clarificado pH6,5	46,2	3,0	53,4	53,4	1,1	1,1
Q100	46,6	1,0	18,4	34,5	1,1	1,0
Q300	60,7	0,9	15,3	28,8	1,4	1,3
Crio-pH4,0 (Q100)	57,7	0,7	11,7	63,6	1,4	1,2
Crio-pH4,0 (Q300)	95,6	0,7	12,6	99,0	2,2	1,6
Pool Crio	76,7	1,4	24,3	71,9	1,8	1,4
Pool SP (Q100 + Q300)	92,3	0,7	11,6	46,7	2,2	1,1
IMAC F1	86,3	0,6	10,6	92,0	2,0	0,9

Figura 22 - Pureza e recuperação de PspA4Pro nas frações do processo nº2

As duas frações onde a PspA4Pro eluiu da Q-Sepharose (Q100 e Q300) foram submetidas à crioprecipitação em pH4,0, onde comportaram-se de maneira distinta. Enquanto somente 63% da PspA4Pro foi recuperada na fração Crio-pH4,0 da Q100, sem aumento da pureza, a pureza da fração Crio-pH4,0 oriunda da Q300 passou de 60% para 95%, com recuperação de 99%. A diferença nos resultados da purificação destas duas frações da Q-Sepharose foi notável e poderia ter relação com o possível enovelamento incorreto de uma parte da PspA4Pro sintetizada neste cultivo, que teria sido eluída na Q100, e também à maior quantidade de impurezas nesta fração, favorecendo o arraste da PspA4Pro, como na precipitação em pH4,0 do Homogenato. As duas frações Crio-pH4,0(Q100) e Crio-pH4,0(Q300) foram então reunidas e o *Pool* Crio aplicado à SP-Sepharose, mas assim como ocorreu na Q-Sepharose, a proteína foi eluída em frações distintas, que foram misturadas novamente em uma única fração (*Pool* SP) e aplicadas à IMAC-níquel. O *Pool* SP teve recuperação de 46,7% em relação ao *Pool* Crio e a pureza aumentou de 76,7% para 92,3% (FP=1,6). Por não possuir cauda de histidina, a PspA4Pro foi recolhida na fração não adsorvida da cromatografia de afinidade por metais que, embora tenha tido boa recuperação, não elevou a pureza da PspA4Pro. A Figura 23 mostra os SDS-PAGE das etapas da purificação nº 2 onde a PspA4Pro foi recolhida. Observa-se uma banda de PspA4Pro no pellet do clarificado em pH6,5, indicando a presença de PspA4Pro insolúvel após a clarificação. A purificação nº2 foi a única onde PspA4pro insolúvel foi encontrada nesta etapa. Após a Q-Sepharose ocorreu grande redução no número de bandas correspondentes a proteínas contaminantes, mas ao final da cromatografia de afinidade a PspA4Pro não atingiu a pureza desejada. A Figura 24 descreve as conclusões tiradas dos resultados das operações realizadas durante a purificação nº2

Figura 23 - Compilação dos SDS-PAGE da purificação nº2. A) Padrão de peso molecular. B) Homogenato. C) Clarificado pH6,5. D) Pellet ressuspendido do Clarificado pH6,5. E) Q100. F) Q300. G) Pool Crioprecipitação pH4,0. H) Pool SP. I) IMAC F1

Figura 24 - Etapas eliminadas, etapas mantidas e conclusões retiradas dos resultados do processo de purificação nº2.

5.3 Processos de purificação nº3 e nº4 (Cultivos 3 e 4)

Uma vez que os processos nº3 e 4 seguiram passos semelhantes (Figura 25) eles serão discutidos em conjunto. A diferença entre eles foi o uso de porções de determinadas frações do processo nº4 para avaliar a cromatografia em Capto-MMC com o objetivo de verificar em qual posição da sequência de cromatografias sua inclusão seria mais vantajosa.

Figura 25 - Sequência de operações realizadas durante os processos de purificação nº3 e nº4.

Os quadros em azul descrevem operações realizadas somente na purificação nº4.

A Figura 26 descreve a ruptura celular das células nos dois processos. Observa-se que aos 4 minutos a extração de proteínas (A280) e a ruptura celular (DO600) atingiram o equilíbrio nos dois processos.

Figura 26 - Acompanhamento da ruptura celular, extração de proteínas e temperatura dos processos de purificação nº3 e nº4.

O teste das diferentes concentrações de CTAB na purificação nº3 mostrou que o sobrenadante ficava transparente em concentrações acima de 0,2% CTAB. Desta forma, o Homogenato foi clarificado com 0,2%CTAB. Uma vez que o Homogenato deve ser processado rapidamente para ser aplicado na resina cromatográfica, a pureza da PspA4Pro só foi medida posteriormente à clarificação, não tendo sido, portanto, um parâmetro de escolha da concentração de detergente utilizada no Homogenato. A pureza das amostras no teste de CTAB é mostrada na Tabela 6.

Tabela 6 - Pureza de PspA4Pro nas diferentes concentrações de CTAB testadas no Homogenato da purificação nº3.

Concentração CTAB (%)	Pureza PspA4Pro(%)	Concentração CTAB (%)	Pureza PspA4Pro(%)
0,00	57,3	0,25	83,8
0,05	68,0	0,30	84,4
0,10	60,0	0,35	83,3
0,15	67,1	0,40	71,2
0,20	76,6	0,50	74,8

Todas as amostras tratadas com CTAB apresentaram pureza de PspA4Pro maior do que aquela da amostra não tratada, com a maior pureza sendo atingida na concentração de 0,3%CTAB. A redução da pureza nas duas últimas amostras pode ser devida à liberação no meio, pelo detergente, de proteínas que ainda estavam presas a restos de membrana celular, pois quando CTAB nas concentrações de 0,5%, 1,0% e 2,0% foi adicionado a uma solução de PspA4Pro purificada (6 mg/mL, pureza >95%) e a uma solução de albumina (20 mg/mL) não foi observada precipitação em nenhuma das proteínas.

O teste de precipitação com diferentes concentrações de CTAB foi repetido no processo nº4 (Figura 27). Desta vez as proteínas do sobrenadante foram quantificadas por Lowry e os dados utilizados para calcular a pureza e recuperação de PspA4Pro.

Figura 27 - Evolução da pureza e recuperação da PspA4Pro no sobrenadante das amostras do homogenato da purificação nº4 com o aumento da concentração de CTAB.

Neste experimento observou-se perda de 30% da PspA4Pro já na concentração de CTAB de 0,15%, acompanhada de um aumento de pureza de 20% em relação CTAB 0,10%. Levantou-se a hipótese de que as condições de cultivo empregadas para a produção da proteína interferiram no *pool* de proteínas totais após a ruptura celular e, conseqüentemente, na precipitação com CTAB, indicando a importância de se padronizar as condições de produção da proteína antes da sua purificação. Embora este passo tenha aumentado significativamente a pureza, seria necessário avaliar a concentração ótima do detergente antes de cada precipitação para cada cultivo diferente.

Embora tenham sido seguidas as mesmas etapas, o processo de purificação nº3 apresentou melhor pureza final e recuperação de proteína (Tabela 7 e Figura 28). O processo de purificação nº4 apresentou perda de 40,5% de PspA4Pro na precipitação com CTAB 0,2% (Tabela 8 e Figura 29). O teste de precipitação com diferentes concentrações de CTAB, realizado paralelamente, mas cujos resultados foram analisados depois da clarificação, confirmou este resultado, mostrando que nesta purificação a perda de PspA4Pro aumentou com concentrações de CTAB superiores a 0,15%. Isso reforça a necessidade de avaliar a concentração ideal de CTAB para cada novo lote de material a ser purificado.

Também ocorreram perdas maiores na Q-Sepharose e na SP-Sepharose no processo nº4, o que resultou na grande diferença de

recuperação da PspA4Pro ao final destes dois processos, 17,4% no processo nº3 e 3,1% no nº4 (Tabelas 7 e 8). Em ambos os processos a crioprecipitação em pH4,0 elevou a pureza de PspA4Pro para valores acima de 90%, com recuperação de 59% na purificação nº3 e 51% na purificação nº4. A pequena diferença na recuperação de PspA4Pro nesta etapa não pôde ser correlacionada a diferenças na pureza da amostra no momento da precipitação (75% purificação nº3 contra 74,5% purificação nº4), e poderia ser devida à variação no *pool* de proteínas contaminantes em cada amostra.

Tabela 7 - Tabela de purificação do processo nº3

Fração	Pureza PspA4Pro (%)	PspA4Pro total (g)	Recuperação geral PspA4Pro (%)	Recuperação por etapa PspA4Pro (%)	Fator de Purificação geral (Veze)	Fator de Purificação por etapa (Veze)
Homogenato	51,8	4,5	100,0	100,0	1,0	1,0
Clarificado 0,2%CTAB	62,4	4,5	100,0	100,0	1,2	1,2
Q 300	75,0	2,7	60,3	57,9	1,4	1,2
Crio+pH4	90,3	1,6	35,7	59,1	1,7	1,2
SP 650	94,5	1,0	21,9	61,4	1,8	1,04
MMC F1	98,5	0,8	17,4	79,4	1,9	1,04

Tabela 8 - Tabela de purificação do processo nº4

Fração	Pureza PspA4Pro (%)	PspA4Pro total (g)	Recuperação geral PspA4Pro (%)	Recuperação por etapa PspA4Pro (%)	Fator de Purificação geral (Veze)	Fator de Purificação por etapa (Veze)
Homogenato	40,5	14,45	100,0	100,0	1	1
Clarificado 0,2%CTAB	56,5	8,6	59,5	59,5	1,4	1,4
Q 300	74,5	2,0	13,7	22,9	1,8	1,3
Crio+pH4	93,2	1,02	7,1	51,9	2,3	1,3
SP 650	94,2	0,5	3,1	43,6	2,3	1,01
MMC 250	96,5	0,5	3,1	100,9	2,4	1,02

Figura 28 - Pureza e recuperação de PspA4Pro nas frações do processo nº3

Figura 29 - Pureza e recuperação de PspA4Pro nas frações do processo nº4

No processo de purificação nº3, a proteína não foi totalmente adsorvida pela Capto-MMC quando aplicada a pH 6,5 e NaCl 650 mM (65 mS/cm), sendo a maior parte (79,4%) recuperada na fração não adsorvida. Já no processo nº4, em que a proteína foi aplicada à coluna com força iônica menor (pH 6,5 e NaCl 300 mM, 35 mS/cm), observou-se completa adsorção da proteína pela resina, sendo eluída completamente com L-arginina 250 mM. Além disso, a eluição com L-arginina mostrou-se mais eficiente do que com NaCl (testada no

laboratório para purificação de PspA de outro clado), tendo toda a PspA4Pro sido recuperada. Embora o fator de purificação da Capto-MMC e da SP-Sepharose tenham sido baixos, estas etapas foram necessárias para atingir a pureza requerida.

As Figura 30 e Figura 31 mostram os SDS-PAGE das etapas onde a PspA4Pro foi eluída nas purificação n°3 e 4, respectivamente. O maior número de bandas de contaminantes no Homogenato do processo n°4 evidencia a diferença de pureza após a ruptura celular (Tabelas 7 e 8). Como nas purificações anteriores, observou-se grande redução na quantidade de bandas de contaminantes após a crioprecipitação, quando a pureza de PspA4Pro se tornou superior a 90%.

Figura 30 - Compilação dos SDS-PAGE da purificação n°3. A) Padrão de peso molecular. B) Homogenato. C) Clarificado 0,2% CTAB. D) Q300. E) Crioprecipitado pH4,0. F) SP650. G) MMC F1.

Figura 31 - Compilação dos SDS-PAGE da purificação nº4. A) Padrão de peso molecular. B) Homogenato. C) Clarificado 0,2% CTAB. D) Q300. E) Crioprecipitado pH4,0. F) SP650. G) MMC250.

5.3.1 Avaliação da inclusão da cromatografia mista na sequência de etapas do processo nº4

Após a clarificação com CTAB, uma parte do Clarificado CTAB 0,2% (90 mL) foi aplicada à cromatografia mista em Capto-MMC e o resultado foi comparado com o obtido quando o mesmo material foi purificado em Q-Sepharose (Figura 32).

Figura 32 - Comparação entre Q-Sepharose e Capto-MMC após a clarificação com CTAB 0,2% do material proveniente do processo de purificação nº 4.

A Capto-MMC, quando equilibrada com fosfato-Na 10 mM pH6,5 (1,5 mS/cm) e realizada após a clarificação, mostrou-se menos eficiente do que a Q-Sepharose. Ambas as cromatografias apresentaram baixa recuperação na PspA4Pro, mas enquanto na Q-Sepharose a baixa recuperação foi devida à eluição de 45% da proteína na fração Q100, com pureza inferior à inicial, na Capto-MMC menos de 5% da PspA4Pro foi encontrada na fração não adsorvida ou nas eluições, indicando que a proteína permaneceu adsorvida na resina.

A cromatografia em Capto-MMC também foi empregada após a crioprecipitação em pH4,0 e os resultados obtidos foram comparados com os da cromatografia em SP-Sepharose (Figura 33). Neste caso, a proteína foi aplicada à coluna equilibrada com acetato-Na 25 mM + NaCl 300 mM pH4,0 (condutividade 35 mS/cm).

Figura 33 - Comparação da SP-Sepharose e da Capto-MMC após a crioprecipitação em pH4,0 do material proveniente do processo de purificação nº 4.

A pureza da PspA4Pro obtida após a cromatografia na Capto-MMC subiu de 93,2% (na fração Crio-pH4,0) para 93,6% (FP: 1,004), ou seja, a MMC praticamente não contribuiu para a purificação. Após a SP-Sepharose, a pureza da fração de eluição aumentou para 94,2% (FP: 1,01). Contudo, a recuperação da PspA4Pro na Capto-MMC foi de 69%, enquanto na SP-Sepharose foi de 52%. Nestas duas cromatografias a condição de adsorção da

amostra foi a mesma, acetato-Na 25 mM pH 4,0 + NaCl 300 mM, porém para eluição da MMC foi necessário empregar uma condição extrema, L-arginina 1M pH8,0 + NaCl 1M, o que indica que a proteína se ligou muito mais fortemente à MMC do que à SP quando foi aplicada em pH abaixo do seu ponto isoelétrico, dificultando a eluição. Por outro lado, quando a PspA4Pro foi aplicada após a SP-Sepharose a pH6,5 em presença de 300 mM de NaCl a eluição da Capto-MMC pôde ser feita com L-arginina 250 mM pH6,5 (Figura 29). Nestas condições as interações hidrofóbicas com a resina foram as principais responsáveis pela adsorção, já que a proteína está com carga global negativa, embora as cargas positivas da porção C-terminal do fragmento clonado (Figura 2) possam ter contribuído para a interação.

Estes resultados indicam que a Capto-MMC poderia ser aplicada como uma etapa de polimento final, caso o processo de purificação empregando apenas as cromatografias de troca iônica não leve à obtenção de PspA4Pro com a pureza requerida. A Figura 34 resume as conclusões retiradas dos resultados das operações realizadas nestas duas purificações.

Figura 34 - Sequência de operações das purificações nº3 e 4 e conclusões retiradas dos resultados destes processos.

5.4. Processo de purificação nº 5 (Cultivo 1)

O processo nº5 foi o primeiro a utilizar a biomassa de um cultivo já empregado para purificação (Cultivo nº1, Purificação nº1), desta vez realizando a clarificação com CTAB e testando a Capto-MMC como alternativa à Q-Sepharose e à SP-Sepharose (Figura 35).

Figura 35 - Sequência de operações realizadas durante o processo de purificação nº5

A Figura 36 descreve queda da concentração celular (DO600) e a liberação de proteínas (A280) e variação de temperatura durante a ruptura celular da biomassa no processo de purificação nº5 realizado com a biomassa celular do Cultivo nº1, que decorreu como nos processos anteriores.

Figura 36 - Acompanhamento da ruptura celular, extração de proteínas e temperatura no processo de purificação nº5.

Durante o teste da concentração ótima de CTAB do processo de purificação nº 5, foram medidas viscosidade e condutividade no sobrenadante das amostras precipitadas, a fim de procurar uma relação entre essas variáveis e a concentração ótima de CTAB (Figura 37).

Figura 37 - Condutividade e viscosidade do sobrenadante das amostras precipitadas com diferentes concentrações de CTAB no processo de purificação nº 5.

* O valor da viscosidade da água (1mPA/cm) foi descontado dos valores das amostras.

De maneira geral, os detergentes aumentam a viscosidade e, se forem carregados, a condutividade do meio, por isso era esperado que os valores destes parâmetros continuassem a subir com o aumento da concentração de CTAB. Contudo, o que se observou foi uma queda na viscosidade e um equilíbrio da condutividade em concentrações em de CTAB superiores 0,15%. No teste de precipitação, observou-se sobrenadantes transparentes nas

amostras com concentrações de CTAB superiores a 0,15%. Considerando estes resultados, aplicou-se esta concentração para a clarificação do Homogenato.

Diferente do processo nº1, o processo nº5 atingiu pureza de PspA4Pro de 95%, com recuperação final de 14,8% (Tabela 9 e a Figura 38). A Clarificação com CTAB 0,15% teve recuperação de 90% e fator de purificação de 1,40, sendo a etapa do processo que mais contribuiu com o aumento da pureza da PspA4Pro. Durante a cromatografia de troca aniônica, ocorreu perda de cerca de 50% da PspA4Pro, que não foi recuperada em nenhuma das frações recolhidas e um aumento pequeno na pureza (FP=1,06). A proteína perdida pode ter permanecido adsorvida à resina ou ter degradado durante o processo. O baixo fator de purificação da Q-Sepharose pode ser devido à pureza inicial elevada (>80%) do clarificado com CTAB 0,15%, tal como ocorreu na SP-Sepharose após a crioprecipitação em pH4,0.

Tabela 9 - Tabela de purificação do processo nº 5

Fração	Pureza PspA4Pro (%)	PspA4 Pro total (g)	Recuperação geral PspA4Pro (%)	Recuperação por etapa PspA4Pro (%)	Fator de Purificação geral (Veze)	Fator de Purificação por etapa (Veze)
Homogenato	58,8	2,2	100,0	100	1	1
Clarificado CTAB 0,15%	82,6	2,0	90,2	90,2	1,4	1,4
Q 300	87,2	0,9	47,2	52,4	1,5	1,1
Crio + pH4,0	94,1	0,4	19,3	40,8	1,6	1,1
SP 1000	95,0	0,3	14,8	76,9	1,6	1,01

Figura 38 - Pureza e recuperação de PspA4Pro nas frações do processo nº5

A recuperação na crioprecipitação em pH4,0 foi de 40,8%, a menor recuperação nesta etapa dentre todos os processos. Ao final da cromatografia de troca catiônica a PspA4Pro atingiu pureza igual a 95% com recuperação de 76,9% (recuperação final de 14,8%). Este foi o primeiro processo de purificação onde a pureza desejada foi atingida na SP-Sepharose, graças à elevada pureza da PspA4Pro do Homogenato e após a clarificação com CTAB. Isso indica que uma etapa de purificação posterior à troca catiônica poderia ser eliminada, dependendo das condições do material de partida e do fator de purificação das etapas iniciais do processo. A Figura 39 abaixo mostram o SDS-PAGE das etapas da purificação nº5 onde a PspA4Pro foi recolhida.

Figura 39 - Compilação dos SDS-PAGE da purificação nº5. A) Padrão de peso molecular. B) Homogenato. C) Clarificado 0,15% CTAB. D) Q300. E) Crioprecipitado pH4,0. F) SP1000.

5.4.1 Testes com Capto-MMC após a clarificação e após crioprecipitação

A cromatografia de troca aniônica apresentou recuperação de PspA4Pro de 52% na eluição com 300 mM de NaCl com aumento de pureza de 82,6% para 87,2% (FP=1,06). Houve perda de 10% de PspA4Pro na eluição com 150 mM NaCl e de menos de 1% tanto na fração não adsorvida como na eluição com 1000 mM NaCl. A Capto-MMC elevou a pureza para 95% na eluição com 500 mM L-arginina, mas a recuperação nesta etapa foi de somente 5,8%, rendendo uma recuperação geral, a partir do Homogenato, de 1,04%. A maior parte da PspA4Pro recuperada na MMC (22% da PspA4Pro aplicada) foi encontrada na fração não adsorvida e a proteína também não foi recuperada na limpeza com 1000 mM L-arginina em pH8,0. Desta forma, apesar de a pureza ter chegado a 95% com esta cromatografia, a perda da PspA4Pro inviabilizaria seu uso no lugar da troca aniônica (Figura 40).

Figura 40 - Comparação entre as cromatografias de troca aniônica e mista após a clarificação com CTAB 0,15%.

Quando realizada após a crioprecipitação em pH4,0, a cromatografia mista na Capto-MMC resultou em pureza final de 98%, mas com recuperação de 27% da PspA4Pro na eluição com 1000 mM L-arginina a pH4,0, sem perda de proteínas na fração não adsorvida. Após a eluição da MMC com 1000 mM L-arginina a pH4,0, foi feita uma limpeza da resina com L-arginina 1000 mM + 100 mM NaOH onde foi observado um pico de A280, indicando a eluição de proteínas ainda retidas na resina. Contudo, esta fração não foi recolhida para quantificação da PspA4Pro. Embora a Capto-MMC tenha apresentado maior fator de purificação (FP=1,04) em relação à SP-Sepharose (FP=1,01), isso não justificaria o uso da MMC no lugar da troca catiônica nestas condições, dada a diferença na recuperação da PspA4Pro e a elevada concentração de sal necessária para eluir a proteína da resina mista (Figura 41). A Figura 42 resume as conclusões retiradas dos resultados das operações realizadas na purificação nº5.

Figura 41 - Comparação entre as cromatografias de troca catiônica e mista após a crioprecipitação em pH4,0

Figura 42 - Etapas eliminadas, etapas mantidas e conclusões retiradas dos resultados do processo de purificação nº5.

5.5 Processo de purificação nº6 (Cultivo 1)

No processo nº6 foi avaliado o uso de L-arginina como adjuvante durante a precipitação do Homogenato com CTAB para tentar diminuir a perda de PspA4Pro nesta etapa. Também foram testadas clarificação em pH5,5, com

e sem L-arginina, e crioprecipitação em pH5,5 para aplicação da PspA4Pro na Capto-MMC (Figura 43).

Figura 43 - Sequência de operações realizadas durante a purificação nº6.

A Figura 44 mostra a DO600, indicando a concentração de células, e a A280 referente à liberação de proteínas durante a ruptura celular da biomassa no processo de purificação nº6. Ocorreu um problema com o sistema de refrigeração conectado ao GAULIN, o que resultou em um aumento de temperatura ao longo do processo, chegando até 23,7°C. Apesar do problema no controle da temperatura, esta não chegou a oferecer risco de desnaturação, já que a PspA4Pro mostrou-se estável à temperatura ambiente. A DO600 atingiu o equilíbrio aos 4 minutos e a A280 apresentou ligeiro aumento até o final do processo.

Figura 44 - Acompanhamento da ruptura celular, extração de proteínas e temperatura no processo de purificação nº6.

Como o material de partida foi o mesmo do processo de purificação nº5, a concentração de CTAB a ser adicionada ao Homogenato da purificação nº6 foi calculada com base nos resultados daquele processo (ver em Materiais e Métodos, item 4.5.1). Assim, a A280 do Homogenato do processo nº5 foi de 24,4, o volume (V_H) igual a 2000 mL e o volume de CTAB adicionado (V_{CTAB}) igual a 3 mL. Substituindo estes valores na equação, obtém-se $X=16266$. Assim, o volume de CTAB a ser adicionado no Homogenato da purificação nº6 seria dado por:

$$V_{CTAB} = \frac{A280 \times V_H}{16266}$$

A A280 do Homogenato da purificação nº6 foi de 13,84 e o V_H de 1750 mL, resultando num V_{CTAB} igual a 1,49 mL, ou 0,085% CTAB.

Após determinar a concentração de CTAB, foram testadas diferentes estratégias de precipitação do Homogenato do processo nº6 (Tabela 10). Uma vez que a precipitação em pH4,0 mostrou-se ineficiente, a precipitação do Homogenato em pH 5,5 foi avaliada, pois diminuir o pH da amostra até este valor permitiria a aplicação do Clarificado obtido na resina Capto-MMC, já que testes de ligação da PspA4Pro purificada (>95%) realizados no laboratório indicaram absorção da proteína nesta resina em $pH \leq 5,5$. Também foi testada a precipitação com CTAB e crioprecipitação na presença de 0,2 m L-arginina,

que é comumente utilizada no *refolding* de proteínas e para evitar sua agregação (ARAKAWA et al., 2003; ARAKAWA et al., 2011).

Tabela 10 - Testes de clarificação do processo de purificação nº 6.

Amostra	Pureza PspA4Pro	Recuperação PspA4Pro	Fator de Purificação	Eficiência da purificação	Número de etapas
Homogenato	33,3	100,0	1,0	-	-
Clarificado (pH5,5)	33	67,9	1,0	67,9	1
Clarificado (CTAB 0,085%)	44,1	77,0	1,3	100,1	1
Clarificado (L-Arg/CTAB 0,085%)	62	49,4	1,9	93,9	1
Clarificado (L-Arg/CTAB 0,085%) + Crioprecipitado	53	42,4	1,6	33,9	2

Embora as amostras contendo L-arginina tenham tido um aumento maior de pureza da PspA4Pro depois da precipitação com CTAB e da crioprecipitação, elas tiveram menor recuperação da proteína em questão, sugerindo que a L-arginina não foi eficaz para prevenir o arraste da PspA4Pro devido à formação de agregados com outras proteínas durante a precipitação com CTAB e a crioprecipitação. A maior eficiência da purificação foi obtida com a precipitação apenas com CTAB 0,085% sem L-arginina, sendo esta a etapa de escolha para o tratamento do Homogenato.

Ao final do processo de purificação a PspA4Pro atingiu pureza superior a 95% em duas frações da cromatografia em SP-Sepharose. A cromatografia de troca aniônica foi a etapa que mais contribuiu para a pureza da PspA4Pro (FP=1,73) e com recuperação de aproximadamente 90%. Na cromatografia de troca catiônica, a PspA4Pro foi eluída com 1000 mM NaCl em pH4,0 e com 1000 mM NaCl em pH6,5. Na primeira eluição a pureza foi de 98,5% e a recuperação de 31%, enquanto na segunda eluição a pureza foi de 96,9% com recuperação de 58%. Juntando as duas frações, a recuperação final deste processo foi de 33% com relação à PspA4Pro do Homogenato, a melhor

recuperação final dentre todas as purificações realizadas até agora (Tabela 11 e Figura 45). Em uma cromatografia, o ideal é sempre recuperar a proteína de interesse em uma única fração, já que frações distintas aumentam o volume da solução, podendo requerer uma etapa de concentração, apresentam diferentes condutividades e, por vezes, diferentes pH. Contudo, como as duas frações atingiram a pureza requerida, ambas foram consideradas no cálculo de recuperação final.

Tabela 11 - Tabela de purificação do processo nº 6

Fração	Pureza PspA4Pro (%)	PspA4 total (g)	Recuperação geral PspA4Pro (%)	Recuperação por etapa PspA4Pro (%)	Fator de Purificação geral (Vezez)	Fator de Purificação por etapa (Vezez)
Homogenato	33,3	2,5	100	100	1	1
Clarificado CTAB 0,085%	44,1	1,9	77,0	77,0	1,3	1,3
Q300	76,3	1,7	67,0	87,1	2,3	1,7
Crio + pH4,0	88,2	0,9	37,4	55,9	2,7	1,2
SP1000 pH4,0	98,5	0,3	11,6	31,0	3,0	1,1
SP1000 pH6,5	96,9	0,5	21,9	58,4	2,9	1,1

Figura 45 - Pureza e recuperação de PspA4Pro nas frações do processo nº6

A Figura 46 mostra o SDS-PAGE das etapas da purificação nº6 onde a PspA4Pro foi recolhida. Embora visível, a pequena banda observada abaixo da banda de PspA4Pro na fração Pool SP, onde foram reunidas as frações SP1000pH4,0 e SP1000 pH6,5, representa menos de 5% das bandas detectadas na densitometria do SDS-PAGE. Para confirmar a pureza esta amostra foi aplicada à gel filtração em CLAE e a área do pico de PspA4Pro obtido no cromatograma correspondeu mais de 95% da área total dos picos do cromatograma de proteínas recolhidos (Figura 47), confirmando que a pureza da amostra foi alcançada.

Figura 46 - Compilação dos SDS-PAGE da purificação nº6. A) Padrão de peso molecular. B) Homogenato. C) Clarificado 0,085% CTAB. D) Q300. E) Crioprecipitado pH4,0. F) Pool SP1000

Figura 47 - Cromatograma da gel filtração da fração Pool SP da purificação nº6 realizada para confirmar que a pureza de PspA4Pro foi atingida.

5.5.1 Testes com Capto-MMC após a clarificação e após crioprecipitação

Observou-se que o clarificado em pH5,5 foi aplicado à MMC com pureza de 55%, em vez dos 33% medidos logo após a clarificação (Tabela 10). Entre a clarificação e este experimento, foi realizada uma filtração esterilizante do Clarificado em pH5,5 em membrana de 0,22 μ m para permitir seu armazenamento na geladeira enquanto outros experimentos estavam em andamento. Quando a amostra foi retirada para a aplicação na MMC observou-se presença de precipitado, removido por centrifugação. A perda de PspA4Pro devido a esta precipitação foi de 15%. Da Capto-MMC, foram recuperados 32% da PspA4Pro na eluição com 300 mM L-arginina com pureza de 81% (FP=1,4). Isso significa que a recuperação foi menor do que na troca aniônica (87%) e, embora a pureza final fosse maior, o fator de purificação da Q-Sepharose foi superior (1,7 vezes). Novamente, a Q-Sepharose mostrou-se mais adequada como primeira etapa cromatográfica na purificação da PspA4Pro (Figura 48)

Figura 48 - Comparação entre as cromatografias de troca aniônica e mista como primeira etapa cromatográfica do processo de purificação após a clarificação no processo de purificação nº6.

A crioprecipitação em pH5,5 resultou numa pureza de PspA4Pro semelhante àquela da crioprecipitação em pH4,0 (87,9% contra 88,2%) com maior recuperação de PspA4Pro (86,4% contra 55%), mostrando que poderia ser vantajoso realizar a crioprecipitação em pH mais alto, caso a PspA4Pro pudesse ser adsorvida na resina de troca catiônica ou na resina mista nestas condições. Experimentos prévios realizados no laboratório com uma PspA de outro clado mostraram que a proteína poderia ser aplicada em resina de troca aniônica em pH acima do seu pI (CARVALHO et al., 2011), contudo testes de adsorção da PspA4Pro na SP-Sepharose mostraram que a esta PspA não adsorveu nesta resina em $\text{pH} \geq 5$. Como a PspA4Pro aplicada à Capto-MMC em pH5,5 não adsorveu na resina e não houve purificação nesta etapa, a cromatografia de troca catiônica permanece como técnica escolhida após a crioprecipitação pH4,0 (Figura 49). A Figura 50 resume as conclusões retiradas dos resultados das operações realizadas na purificação nº6.

Figura 49 - Comparação entre a cromatografia de troca catiônica após crioprecipitação em pH4,0 e a cromatografia mista após a crioprecipitação em pH5,5

Figura 50 - Etapas eliminadas, etapas mantidas e conclusões retiradas dos resultados do processo de purificação nº6.

5.6 Comparação entre os processos de purificação nº1, nº5 e nº6 realizados a partir do Cultivo 1

No processo de purificação nº 1 foram rompidas 103,77g de biomassa congelada do Cultivo 1 no volume final de Homogenato de 1,68L (61,77g biomassa/L Homogenato). No processo nº 5, a massa rompida foi de 97,98g num volume de 2,0L (48,99g/L) e no processo nº 6 foram rompidas 93,2g em 2,0L (46,6g/L). Apesar de o processo de purificação nº 1 ter partido de uma concentração maior de biomassa, quando os valores de DO600 e A280 foram normalizados de acordo com a concentração de biomassa rompida em cada processo, verificou-se que a ruptura celular nos três processos decorreu de maneira semelhante, com DO600 e A280 atingindo o equilíbrio aos 4 minutos (Figura 51).

Figura 51 - Evolução da A280 e DO600 normalizadas pela concentração de biomassa rompida nos processos de purificação nº1, nº5 e nº6.

Embora as rupturas celulares tenham sido semelhantes nos três processos, a pureza inicial de PspA4Pro no Homogenato variou bastante entre eles. No processo nº1 a pureza relativa inicial foi 16%, consideravelmente menor do que aquelas observadas nos processos nº5 (58,8%) e nº6 (33,3%). Embora um erro na medida da pureza do Homogenato do processo nº 1 fosse possível, o fato de a pureza do Clarificado pH6,5 deste mesmo processo ter sido de 16,8% confirmou o resultado inicial, já que não era esperada mudança significativa da pureza nesta etapa.

Dividindo-se a massa inicial de PspA4Pro pela biomassa rompida nos três processos, se obtêm as seguintes relações: 26,98 mg de PspA4Pro por g de biomassa no processo nº1; 22,45 mg de PspA4Pro por g de biomassa, no nº5; e 26,80 mg de PspA4Pro por g de biomassa no nº6. Assim, a despeito do Homogenato do processo nº 1 ter apresentado maior quantidade de proteínas totais, a relação PspA4Pro/biomassa manteve-se próxima nos três processos. O motivo da maior concentração de proteínas contaminantes no processo nº 1 não foi identificado.

No processo de purificação nº5 a clarificação com CTAB foi a etapa que mais contribuiu para o aumento de pureza ($FP=1,4$) e a etapa com melhor recuperação (90%), resultado melhor do que a mesma etapa no processo nº6 ($FP=1,32$ e recuperação 77%). Embora os processos de purificação nº 5 e 6 tenham vindo do mesmo cultivo e a proporção de PspA4Pro/biomassa tenha sido semelhante, a pureza inicial de PspA4Pro no nº6 foi menor. Os resultados do conjunto das purificações realizadas sugerem que o CTAB não precipita a PspA4Pro e que a perda desta proteína nessa etapa se daria provavelmente por arraste com o precipitado. Desta forma, uma quantidade maior de precipitado devido à maior quantidade de proteínas contaminantes no Homogenato no processo nº 6 deve ter aumentado o arraste de PspA4Pro para o precipitado.

Calculando-se a eficiência do processo de purificação (EPP) somente para a etapa de clarificação dos três processos, obtêm-se o valor de 94,9 na clarificação em pH6,5 (processo nº1), 126,3 na clarificação com 0,15% CTAB (processo nº5) e 101,6 na clarificação com 0,085%CTAB (processo nº6), mostrando que a precipitação com o detergente contribuiu para a purificação da PspA4Pro do Cultivo 1.

Nos 3 processos realizados a partir do Cultivo 1 a etapa cromatográfica com maior FP foi a Q-Sepharose, que teve boa recuperação na purificação nº1 (100%) e na purificação nº6 (87%). A exceção foi a nº5, com recuperação de apenas 52% da PspA4Pro nesta etapa.

Na crioprecipitação em pH4,0 a recuperação da PspA4Pro variou entre 40% e 55% e a pureza ao final desta etapa variando entre 75% e 94%. Diferenças nos resultados desta etapa eram esperadas, dado às diferenças na pureza das amostras eluídas da Q-Sepharose, mas considerando a hipótese

de que a perda de PspA4Pro durante o ajuste para pH4,0 é menor conforme a pureza da amostra é elevada, a baixa recuperação de PspA4Pro nesta etapa durante a purificação nº5 foi inesperada, visto que a pureza da amostra após a Q-Sepharose era de quase 90% e sua causa não foi identificada.

A PspA4Pro chegou à pureza almejada após a SP-Sepharose nas purificações nº5 e nº6. Comparando esta etapa nos dois processos, observou-se maior pureza final após a SP-Sepharose da purificação nº6, a despeito da menor pureza da amostra aplicada à resina. Estes passos diferiram nas condições de equilíbrio e reequilíbrio da resina, feito com tampão de baixa força iônica na purificação nº6, e no preparo da amostra antes da aplicação, que teve sua força iônica reduzida para 20 mS/cm, na purificação nº6, contra 35 mS/cm na purificação nº5. Apesar da força iônica menor na entrada da amostra ter resultado na necessidade de aumentar a concentração de NaCl para eluição da PspA4Pro da SP-Sepharose da purificação nº6, o que levou à sua recuperação em duas frações, isso provocou um aumento da pureza final da PspA4Pro nesta etapa.

5.7 Processo de purificação nº7 (Cultivo 4)

A purificação nº7 visou verificar a reprodutibilidade da sequência de operações do processo de purificação nº6 quando aplicada a um material de partida oriundo de outro cultivo. Assim, ambas apresentam as mesmas etapas, com exceção dos testes na Capto-MMC que foi removida do processo (Figura 52).

Figura 52 - Sequência de operações realizadas na purificação nº7.

A Figura 53 descreve a ruptura da biomassa do Cultivo 4 na purificação nº7. A ruptura celular foi concluída após 2 minutos, como pode ser observado pela curva de DO600, enquanto a liberação de proteínas atingiu seu ápice aos 6 minutos. A temperatura foi bem controlada ao longo do processo, não passando dos 14 °C.

Figura 53 - Acompanhamento da ruptura celular, extração de proteínas e temperatura no processo de purificação nº7.

Amostras de 10 mL do Homogenato foram recolhidas e precipitadas com diferentes concentrações de CTAB. A concentração de proteínas totais estabilizou-se a partir de 0,15% CTAB, enquanto a DO600 o fez a partir de 0,2% CTAB. A queda nas curvas DO600 e recuperação de proteínas totais indica que a adição de CTAB contribuiu tanto para a remoção de proteínas contaminantes como dos debris celulares, o que é conveniente para proteger a resina cromatográfica na qual a amostra será aplicada. Observou-se aumento da pureza relativa da PspA4Pro a partir de 0,1%CTAB, com recuperação variando entre 82% e 59% (Figura 54).

Figura 54 - Avaliação das amostras do Homogenato do processo de purificação nº7 precipitadas com CTAB

Foi observado que os pellets com 0% e 0,05% CTAB eram moles e não foram bem compactados pela centrifugação. A partir de 0,1% CTAB foram obtidos precipitados firmes em todas as amostras. Entre 0% e 0,15% a massa de pellet aumentou de 50 mg para 500 mg. O aumento de massa foi menos pronunciado a partir de 0,15%, com a maior massa de pellet chegando a 535 mg com CTAB 0,25% (Figura 55), concentração onde foi observada a menor recuperação de PspA4Pro. 0,15% CTAB ainda foi a primeira concentração de detergente a partir da qual o sobrenadante se tornou transparente. Desta forma, a concentração anterior, 0,1% CTAB foi aplicada ao Homogenato.

Figura 55 - Massa e altura do precipitado do Homogenato ao final do teste de precipitação com CTAB

Como na purificação nº6, a PspA4Pro atingiu pureza superior a 95% em duas frações eluídas da cromatografia em SP-Sepharose. Neste processo a clarificação com CTAB 0,1% foi a etapa que mais contribuiu para a pureza da PspA4Pro (FP=2,11) com recuperação de quase 100% (Tabela 12 e Figura 56). A cromatografia de troca aniônica foi a etapa onde a maior quantidade de PspA4Pro foi perdida, tal como ocorreu na purificação nº4, que partiu da biomassa do mesmo cultivo. Ainda como na purificação nº6, a PspA4Pro foi eluída da SP-Sepharose em duas frações distintas, a 650 mM NaCl pH4,0 e a 1000 mM NaCl pH6,5.

Tabela 12 - Tabela de purificação do processo nº7

Fração	Pureza PspA4Pro (%)	PspA4Pro total (g)	Recuperação geral PspA4Pro (%)	Recuperação por etapa PspA4Pro (%)	Fator de Purificação geral (Vezez)	Fator de Purificação por etapa (Vezez)
Homogenato	28,20	6,1	100,0	100,0	1,0	1,0
Clarificado 0,1%	59,50	6,1	100,0	100,0	2,1	2,1
Q300	73,7	1,7	27,7	27,7	2,6	1,2
Crio pH4,0	94,0	1,1	18,9	65,8	3,3	1,3
SP650	95,0	0,3	4,3	23,5	3,4	1,01
SP1000	98,0	0,6	9,1	49,7	3,5	1,04
POOL SP	96,5	0,9	14,3	78,2	3,4	1,03

Figura 56 - Pureza e recuperação de PspA4Pro nas frações do processo nº7

Uma vez que as duas frações eluídas da SP-Sepharose atingiram a pureza requerida, elas foram reunidas em uma única fração (Pool SP), com pureza final de 96,5% e recuperação, na etapa, de 78,2%. A recuperação ao final do processo foi de 14,3%, mais de quatro vezes maior do que a recuperação da purificação nº 4, porém ainda abaixo do melhor resultado obtido na purificação nº6. A Figura 57 mostra o resultado do *Western Blot* realizado com o Pool SP da purificação nº7. A ausência de outras bandas indica que a integridade da proteína se manteve, já que a quebra da proteína levaria a formação bandas de menor peso molecular pela reação dos fragmentos com o anticorpo anti-PspA. A Figura 58 mostra o SDS-PAGE das etapas da purificação nº7 onde a PspA foi recolhida.

Figura 57 - Western Blot da purificação nº7. A) Três massas distintas de PspA4Pro foram aplicadas ao SDS-PAGE e transferidas para a membrana. B) Repetição do Western Blot para confirmação do resultado e padrão de peso molecular de proteínas.

Figura 58 - Compilação dos SDS-PAGE da purificação nº7. A) Padrão de peso molecular. B) Homogenato. C) Clarificado 0,1% CTAB. D) Q300. E) Crioprecipitado pH4,0. F) SP650. G) SP1000. G) Pool SP

5.8 Comparação dos processos de purificação nº4 e nº7

A ruptura das células se completou após 2 minutos nos dois processos de purificação, enquanto a liberação de proteínas atingiu o equilíbrio após 4 minutos. Em ambos os processos a temperatura inicial foi de 7 °C, chegando a 12 °C na purificação nº4 e 14 °C na purificação nº7.

Como observado nas três purificações do cultivo nº1, os Homogenatos das duas purificações oriundas do Cultivo nº4 apresentaram purezas de PspA4Pro diferentes (40,5% e 28,2%, respectivamente para os processos nº 4 e nº7). Uma vez que há menos contaminantes na purificação nº4, pôde-se aplicar uma maior concentração de CTAB ao Homogenato com menor arraste de PspA4Pro para o precipitado e como resultado, a concentração ótima de CTAB determinada pelo teste de precipitação foi maior nesta purificação (0,15%) do que aquela determinada pelo teste de precipitação para a purificação nº7 (0,1%). Apesar da diferença na pureza inicial dos Homogenatos, os Clarificados dos dois processos apresentaram pureza relativa superior a 55%. A recuperação de PspA4Pro na clarificação da purificação nº4 foi de 59,5%, enquanto na nº7 foi de 100%. A recuperação menor na purificação nº4 provavelmente foi resultado do fato de a clarificação ter sido feita com 0,2% CTAB. Apesar do resultado do teste de concentração ótima, obtido posteriormente ao tratamento do Homogenato, ter apontado 0,15% CTAB.

Nas duas purificações a Q-Sepharose resultou em recuperação de 23-28% e pureza de PspA4Pro acima de 70%. Apesar de a pureza ter sido semelhante após a Q-Sepharose, a recuperação da crioprecipitação em pH4,0 na purificação nº7 foi cerca de 15% maior do que na nº4. Os dois processos levaram à obtenção de PspA4Pro com a mesma pureza final (96,5%), a qual entretanto foi atingida em etapas distintas: na purificação nº4 foi necessário realizar uma cromatografia mista após a troca catiônica, enquanto na purificação nº7 bastou a troca catiônica. Visto que nos dois processos a pureza foi semelhante após a crioprecipitação em pH4,0, pode-se concluir que foi vantajoso aplicar a amostra com menor força iônica (20 mS/cm na purificação nº7 contra 35 mS/cm na nº4) na cromatografia de troca catiônica, pois isso resultou na eluição de PspA4Pro com pureza superior a 95%, como já havia sido observado na purificação nº6.

5.8 Comparação geral dos sete processos de purificação

A Tabela 13 resume os resultados de todos os processos de purificação realizados. Os processos de purificação nº 3 a 7 permitiram a obtenção da PspA4Pro com a pureza desejada (entre 95 e 98%).

Comparando a eficiência dos processos de purificação que levaram à pureza desejada, o nº 6 foi o mais eficiente (24,4), seguido do nº 7 (12,2). Embora o processo nº 1 tenha apresentado a segunda maior eficiência (13,0), ele não levou à obtenção do produto com a pureza requerida.

Ao longo de todos os processos foram observadas perdas da proteína de interesse, ocasionando baixa recuperação final, especialmente nas etapas cromatográficas. A causa dessas perdas não foi esclarecida, visto que a presença de PspA4Pro não foi observada nas frações não adsorvidas e nem nas de lavagem ou de limpeza das colunas cromatográficas. Assim, as perdas poderiam ser decorrentes da degradação da molécula de interesse ou da adsorção inespecífica na matriz das resinas de cromatografia.

Tabela 13 - Resumo dos resultados finais dos 7 processos de purificação

Purificação (nº)	Pureza final (%)	FP (Final, vezes)	Recuperação (final, %)	Nº de etapas	Eficiência da purificação
1	82,8	5,1	12,8	5	13,0
2	86,3	2,0	10,6	5	4,2
3	98,5	1,9	17,4	5	6,6
4	96,5	2,4	3,1	5	1,5
5	95,0	1,7	14,8	4	6,3
6	96,9	2,9	33,5	4	24,3
7	96,5	3,4	14,3	4	12,2

Apesar de mais estudos serem necessários para definir a concentração ótima de CTAB para uma produção industrial, os resultados obtidos nos diferentes processos de purificação e nos vários testes de precipitação com o detergente indicam que 0,1%CTAB seria uma concentração que poderia ser utilizada na clarificação do homogenato, mesmo daqueles oriundos de biomassas de cultivos distintos, levando ao aumento da pureza de PspA4Pro e

remoção de endotoxina sem grandes perdas da proteína no precipitado da clarificação. Assim, com base no conjunto de resultados apresentados, pode-se concluir então que o processo de purificação da PspA4Pro deveria seguir as etapas apresentadas na Figura 59.

Figura 59 - Estratégia proposta para purificação PspA4Pro

5.9 Atividade da PspA4Pro purificada

A atividade da PspA4Pro foi avaliada pela sua capacidade de ligação à lactoferrina de leite humano (Figura 60). Na Figura 60A observa-se o cromatograma da PspA4Pro pura (tempo de retenção (TR) de 12,85 min) e o da lactoferrina pura (TR = 15,03 min). Após a mistura das duas (Figura 61B), nota-se em vermelho o surgimento de um novo pico correspondente às duas proteínas ligadas (TR = 12,56 min) e o segundo pico corresponde ao excesso

de PspA4Pro (TR = 13,05 min). Aumentando a concentração de lactoferrina percebe-se uma transição para um pico único em verde, TR = 12,692 min, indicando somente proteínas ligadas, e novamente dois picos em azul escuro, quando há excesso de lactoferrina (TR = 15,283 min). É importante ressaltar que o fragmento clonado manteve a capacidade de ligação à lactoferrina mesmo em condições de elevada força iônica, uma vez que a fase móvel contém 300 mM de NaCl e 500 mM de fosfato de sódio, o que indica que o processo de purificação não afetou a atividade da PspA4Pro.

Figura 60 - Ligação PspA4Pro com lactoferrina. A) 2 mg/mL PspA4Pro pura (verde) e 1mg/mL Lactoferrina (azul escuro); B) 2 mg PspA4Pro + 0,5 mg Lactoferrina (vermelho), 1mg PspA4Pro + 1mg Lactoferrina (verde), 1mg PspA4Pro + 2 mg Lactoferrina (azul escuro).

5.10 Determinação da massa molecular da PspA4Pro por CLAE

A massa molecular da PspA4Pro calculada através da curva padrão de proteínas globulares foi de 111kDa, enquanto a massa molecular calculada pela curva de dextrana foi de 49kDa. Destes valores, aquele que mais se aproximou da massa molecular teórica do fragmento, 43kDa (PROTEIN CALCULATOR, 2012) foi aquele calculado com a curva de dextrana, que é um polímero linear de glicose. A PspA4Pro é rica em α -hélice, possuindo uma estrutura *coiled-coil* que lhe dá o formato alongado, como um bastão, e provavelmente é isto que faz com que sua massa molecular se aproxime mais do valor teórico quando determinada através de uma curva de calibração em gel filtração feita com padrões lineares, como a dextrana, do que com padrões de proteínas globulares.

5.11 Estrutura secundária e estabilidade térmica e ao pH da PspA4Pro purificada

Espectros de dicroísmo circular (DC) foram obtidos para verificar se a estrutura secundária da PspA4Pro foi preservada durante o processo de purificação. Esses espectros foram obtidos tanto em tampão fosfato de sódio 10 mM pH7,0, como em tampão fosfato de sódio 10 mM pH7,0 em presença de 0,15% de CTAB (Figura 61). Observou-se que o maior vale na medida da elipticidade molar ocorreu entre 210 e 223nm, comprimentos de onda referentes à α -hélice. Este resultado condiz com a construção da PspA4Pro recombinante, que contém a região rica em α -hélice da porção N-terminal da PspA. O aumento da elipticidade molar entre 200 e 240nm indica perda da estrutura da PspA4Pro quando em tampão contendo CTAB. Esta perda, contudo, foi reversível, já que a PspA4Pro purificada e analisada em tampão fosfato já passou por uma etapa de precipitação em CTAB durante a clarificação, ou seja, a proteína recuperou sua estrutura após a retirada do CTAB.

Figura 61 - Elipticidade Molar da PspA4Pro, em diferentes comprimentos de onda, na presença e ausência de CTAB

A Figura 62 compara a elipticidade molar de uma amostra de PspA4Pro aquecida a 100 °C e posteriormente resfriada, com a elipticidade de uma amostra que não passou por este tratamento. Já a Figura 63 mostra a flutuação da elipticidade molar no comprimento de onda de 220nm durante o aquecimento e o resfriamento da proteína.

Figura 62 - Elipticidade Molar da PspA4Pro, em diferentes comprimentos de onda, em amostra que passou por aquecimento e resfriamento e em amostra sem tratamento térmico.

Figura 63 - Mudança na estrutura da PspA4Pro com a variação da temperatura da amostra

A sobreposição das curvas na Figura 62 indica que o aquecimento da PspA4Pro não causou a perda irreversível da estrutura da proteína, o que é confirmado pela sobreposição das curvas de aquecimento e resfriamento da Figura 64. Nota-se na Figura 63 que há um momento durante o aquecimento, entre 40°C e 50°C, em que a proteína apresentou uma estrutura intermediária mais resistente à mudança de temperatura. Desta forma, pode-se dividir a curva em duas regiões distintas, entre 15°C e 50°C e entre 42°C e 95°C e para cada uma destas regiões calculou-se a T_M (temperatura onde a proteína perde metade da sua estrutura original) (Figura 64 e Tabela 14).

Figura 64 - Alteração da estrutura da PspA4Pro durante o aquecimento e resfriamento entre 15°C e 50°C e entre 40°C e 95°C.

Tabela 14 - TM da PspA4Pro em intervalos de temperatura distintos.

Amostra	TM (°C)	erro
PspA4Pro 15 a 50 °C	36,781	0,0642
PspA4Pro 50 a 15 °C	35,827	0,0996
PspA4Pro 40 a 95 °C	67,501	0,164
PspA4Pro 95 a 40 °C	65,215	0,161

Observa-se que as TM de aquecimento e resfriamento foram bastante parecidas em ambos os intervalos de temperatura analisados, o que condiz

com a sobreposição das curvas observadas nas Figuras 63 e 64 e confirma a reestruturação da PspA4Pro à sua conformação original após o aquecimento.

A Tabela 15 mostra os resultados da deconvolução da elipticidade molar da PspA4Pro utilizando os algoritmos Contin e CDSSTR para uma amostra de proteína que passou por aquecimento e resfriamento e outra sem tratamento térmico.

Tabela 15 - Estruturas secundárias da PspA4Pro obtidas por diferentes algoritmos de deconvolução.

	Contin			CDSSTR	
	Não aquecido	Aquecido		Não aquecido	Aquecido
Alfa-hélice	98,7	99,1	Alfa-hélice	82	79
Folha-Beta	1,2	0,9	Folha-Beta	8	8
Giros	0,1	0	Giros	6	4
Desordenado	0	0	Desordenado	4	8
Total	100	100	Total	100	99

Os dois algoritmos utilizados mostram que, como esperado, a estrutura α -hélice foi majoritária na PspA4Pro independentemente do aquecimento. As proporções das estruturas nas amostras com e sem tratamento térmico foram semelhantes, confirmando que a perda de estrutura observada durante o aquecimento (Figura 64) foi reversível.

A proteína conservou melhor sua estrutura em pH ácidos, com as maiores perdas de estrutura ocorrendo em pH 8,5 e 9,0. A proteína mostrou-se mais estruturada em pH 5,0, valor próximo ao seu pI. A elipticidade em pH 4,0, que foi o menor valor de pH da amostra durante o processo de purificação, foi semelhante àquela dos pH próximos à neutralidade, indicando que as etapas de crioprecipitação em pH 4,0 e cromatografia de troca catiônica não comprometeriam a estrutura da proteína e não promoveriam sua precipitação (Figura 65).

Figura 65 - Elipticidade molar da PspA4Pro em diferentes valores de pH.

5.13 Remoção de endotoxina

Por ser um detergente carregado positivamente, o CTAB foi o responsável pela grande redução na concentração de LPS durante a clarificação (Tabela 16). A remoção de LPS na clarificação resulta em menor número de moléculas competindo pelos ligantes da resina de troca aniônica, melhorando a capacidade adsorção e protegendo a resina, o que aumenta sua vida útil. A quase totalidade do LPS remanescente após a clarificação com CTAB foi removido na Q-Sepharose e na crioprecipitação em pH4,0. Após a SP-Sepharose, a PspA4Pro foi precipitada com etanol 80%, para troca de tampão e redução do volume da amostra para aplicação na resina de poli- ϵ -lisina. Nesta etapa ocorreu perda de PspA4Pro, o que poderia explicar o aumento na concentração de LPS/mg PspA4Pro.

Uma vez que a massa de PspA4Pro por dose da vacina conjugada seria de aproximadamente 45 μ g (PERCIANI et al., 2013), haveria 1,8x10⁻⁴ UE/dose proveniente da PspA4Pro purificada na vacina conjugada. Este valor não representaria a concentração final de LPS por dose da vacina, já que seria

necessário considerar o LPS proveniente do PS, mas ainda está muito abaixo daquele recomendado para vacinas de subunidades recombinantes e de polissacarídeos, que é de <20EU/dose (BRITO et al., 2010). Comparativamente, amostras comerciais da vacina pneumocócica conjugada Pevnar apresentaram concentração de endotoxinas da ordem de 0,2UE/dose. Apesar de a poli- ϵ -lisina ter reduzido em quase 10 vezes a concentração de LPS, esta já estava abaixo dos valores recomendados na após a crioprecipitação em pH4,0 ($1,35 \times 10^{-3}$ EU/mL), o que tornaria desnecessário o uso da resina e a precipitação alcoólica que a precedeu, uma vez que o processo de purificação estabelecido, realizado em condições de boas práticas de produção, com o uso de vidrarias, equipamentos e água apirogênica seria capaz de eliminar o LPS até a obtenção do produto final.

Tabela 16 - Quantificação de endotoxina ao longo do processo de purificação nº7

Amostra	UE/mg PspA4Pro	Redução LPS %
Homogenato	933,8	0
Clarificado s/ CTAB	874,0	6,4
Clarificado 0,1%	33,0	96,5
Q300	17,4	98,1
Crio pH4,0	0,03	99,9
Pool SP	0,07	99,9
Pool SP + poli- ϵ -lisina	0,004	99,9

UE – unidades endotóxicas determinadas pelo método de *Limulus amoebocyte lysate* (LAL).

6 CONCLUSÕES

- A ruptura celular e liberação de PspA4Pro completaram-se após no mínimo 4 minutos de recirculação no homogeneizador contínuo de alta pressão, sendo recomendado não ultrapassar 10 minutos de recirculação, pois foi observado aumento na temperatura da amostra mesmo acoplado um sistema de refrigeração ao equipamento.
- A precipitação do Homogenato com detergente CTAB aumentou a pureza relativa da PspA4Pro, ajudou na formação de um pellet firme após a centrifugação e contribuiu para eliminação de LPS, o que indicou que mesmo que este detergente não seja comumente utilizado na purificação de proteínas, ele pode ser empregado com sucesso neste tipo de processo. Embora a PspA4Pro purificada não tenha precipitado na presença do detergente, ela poderia ser arrastada para o pellet pela precipitação de contaminantes, ocasionando diminuição na recuperação geral de PspA4Pro no processo.
- A concentração ótima de CTAB a ser aplicada no Homogenato variou de acordo com o material de partida da purificação e precisou ser determinada no início de cada processo. Para que este processo possa ser aplicado em uma produção industrial a concentração de CTAB deve ser definida. Com base no conjunto dos resultados a concentração de 0,1%CTAB garantiria aumento de pureza se perda grande de PspA44Pro no precipitado.
- A cromatografia de troca aniônica mostrou-se a mais adequada como primeira etapa cromatográfica do processo, pois a amostra pôde ser aplicada nas mesmas condições de pH e força iônica do clarificado. A cromatografia de troca catiônica não poderia ser empregada no início do processo de purificação, pois a acidificação do Homogenato para pH4,0, necessária para aplicação nesta resina, resultou em perda de grande parte da PspA4Pro.
- A PspA4pro foi adsorvida mais fortemente à SP-Sepharose em baixa força iônica. Nesta condição foi necessário empregar 1M de NaCl para sua eluição completa e a proteína foi recolhida com pureza

superior àquela dos testes onde a PspA4Pro foi aplicada à SP-Sepharose em alta força iônica.

- A cromatografia mista em Capto-MMC não teve resultado superior quando comparada às trocas aniônica e catiônica, além de ter sido difícil determinar as condições de adsorção e eluição da PspA4pro nessa resina. Uma vez que foi possível alcançar a pureza desejada de PspA4pro após a cromatografia em SP-Sepharose, a cromatografia mista foi retirada do processo de purificação.
- A cromatografia hidrofóbica foi descartada devido à baixa recuperação da proteína de interesse e baixo fator de purificação alcançado. A cromatografia de afinidade por metais não resultou em purificação da PspA4Pro, por isso seu uso também foi descartado.
- A PspA4Pro purificada manteve sua capacidade de ligar-se à lactoferrina humana e sua estrutura secundária correta, como demonstrado pelo espectro de dicroísmo circular.
- A cromatografia de exclusão molecular mostrou correspondência entre a massa molecular teórica e aquela determinada pela curva de calibração de dextrana, um polímero linear, o que foi condizente com a estrutura “coiled-coil” alongada da PspA4Pro e que se projeta para fora para cápsula polissacarídica do pneumococo.
- A PspA4Pro purificada foi estável em pH ácido e não sofreu precipitação isoelétrica quando em pH próximo ao pI.
- Quando resfriada após aquecimento a 100 °C a PspA4Pro recuperou sua conformação original. Ela também apresentou uma conformação intermediária termicamente estável entre 40 °C e 60 °C.
- O processo de purificação estabelecido rendeu a PspA4Pro com pureza >95%, que manteve sua capacidade de ligação à lactoferrina humana, apresentou a estrutura secundária esperada e foi reconhecida por um anticorpo anti-PspA4. Realizado em condições de boas práticas de purificação a concentração de endotoxina no produto final atenderia os requisitos para o uso na produção de vacina

REFERÊNCIAS*

ARAKAWA, T.; TSUMOTO, K. The effects of arginine on refolding of aggregated proteins: not facilitated refolding, but suppress aggregation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 304, p. 148-152, 2003.

ARAKAWA, J.; UEGAKI, M.; ISHIMIZU, T. Effects of L-arginine on solubilization and purification of plant membrane proteins. **Protein Expression and Purification**. v. 80, p. 91-96, 2011.

ASENJO, J. A. **Separation Processes in Biotechnology**. New York: Marcel Dekker, 1990, 228 p.

BANG, F. B. A bacterial disease of limulus polyphemus. **Bulletin of the Johns Hopkins Hospital**. v. 98, p. 325-351, 1956.

BEALL, B.; GHERARDI, G.; FACKLAM, R. R.; HOLLINGSHEAD, S. K. Pneumococcal PspA sequence types of prevalent multiresistant pneumococcal strains in the United States and of internationally disseminated clones. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 3663-3669, 2000

BONNERJEA, J.; OH, S.; HOARE, M.; DUNHILL, P. Protein purification - the right step at the right time. **Bio-Technology** v. 4, p. 954-958, 1986.

BRAMBURE, R.; GUPTA, D.; RATHORE, A. S. A novel multimodal chromatography based single step purification process for efficient manufacturing of an E. coli based biotherapeutic protein product. **Journal of Chromatography A**. v.1314, p. 188-198, 2013

*De acordo com:

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

BRILES, D. E.; HOLLINSHED, S.; SWIATLO, E.; BROOKS-WALTER, A.; SZALAI, A.; VIROLAINEN, A.; MCDANIEL, L. S.; BENTON, K.; WHITE, P.; PRELLER, K.; HERMANSSON, A.; AERTS, P. C.; DIJK, H. V.; CRAIN, M. J. PspA and PspC: their potential for use as pneumococcal vaccines. **Microbial Drug Resistance**, v. 3, p. 401-408, 1997.

BRITO, L. A.; SINGH, M. Acceptable Levels of Endotoxin in Vaccine Formulations During. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 100, p. 34-37, 2011

CARVALHO, R. J. **Purificação de um fragmento recombinante de PspA3 de *S. pneumoniae* em *E. coli***. 2009. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

CARVALHO, R. J.; CABRERA-CRESPO, J.; TANIZAKI, M. M.; GONÇALVES, V. M. Development of production and purification processes of recombinant fragment of pneumococcal surface protein A in *Escherichia coli* using different carbon sources and chromatography sequences. **Applied Microbiology Biotechnology**. v. 94, p. 683–694, 2012.

CREIGHTON, T. E. **Proteins: Structure and molecular properties**. Michigan: W. H. Freeman, 1984. 507 p.

DOMÈNECH, B.; BASTOS-ARRIETA, J.; AMANDA ALONSO, A.; MACANÁS, J.; MUÑOZ, M.; MURAVIEV, D. N. Bifunctional Polymer-Metal Nanocomposite Ion Exchange Materials, Ion Exchange Technologies. 2012 Disponível em <<http://www.intechopen.com/books/ion-exchange-technologies/bifunctional-polymer-metal-nanocomposite-ion-exchange-materials>> Acesso em 01 nov 2013.

FREIFELDER, D. **Physical Biochemistry: Applications to Biochemistry and Molecular Biology 2 ed.** Michigan: W. H. Freeman, 1982. 761 p.

GE Lifescience. Capto MMC Instruction/Protocol. Disponível em: <<http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/productByld/pt/GELifeSciences/17531702>> Acesso em 02 nov 2013.

Gentaur BVBA. Ni-IDA-Agarose, 2009. Disponpivel em <<http://www.gentoprice.com/ni-ida-agarose.htm>> Acesso em 01 nov 2013.

HARRISON, ROGER G., **Protein Purification Process Engineering.** New York: Marcel Dekker, 1993. 400 p.

HELLER, R. Structure of Visual Pigments. I. Purification, Molecular Weight, and Composition of Bovine Visual Pigment₅₀₀. **Biochemistry**, v. 7, p. 2906-2913, 1968.

HILBRIG, F., FREITAG, R. Protein purification by affinity precipitation. **Journal of Chromatography B**, v. 790, p. 79–90, 2003.

JANSON, J. C.; RYDEN, L. **Protein Purification: Principles, High Resolution Methods, and Applications 2. ed.** Now York: V. C. H Publishing, 1990. 532 p

JEDRZEJAS, M. J.; LAMANI, E.; BECKER, R. S. Characterization of selected strains of Pneumococcal surface protein A. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 33121-33128, 2001.

KALEAS, K. A.; SCHMELZER, C. H.; PIZARRO, S. A. Industrial case study: Evaluation of a mixed-mode resin for selective capture of a human growth factor recombinantly expressed in *E. coli*. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 235–242, 2010.

KARMALI, A. Cromatografia de afinidade com metal imobilizado e suas variantes. Separação e purificação de proteínas. Lisboa: **Boletim de Biotecnologia**, 2001. 24 p.

LAEMMLI, U.K.; Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 682-685, 1970.

LANDERS, R. J.; WINTERS, M. A.; MEACLE, F. J.; BUCKLAND, B. C.; LEE, A. L. Fractional precipitation of plasmid DNA from Lysate by CTAB. **Biotechnology and Bioengineering**, v.7, p. 776-784, 2002

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

MADHI, S. A.; PELTON, S. I. Epidemiology, diagnosis, and treatment of serious pneumococcal infection in children. In: SIBER, G.R. et al. **Pneumococcal vaccines: the impact of conjugate vaccine**. Washington, D. C.: ASM Press, 2008. p. 95-116.

MANGTANI, P.; CUTTS, F.; HALL, A. J. Efficacy of polysaccharide pneumococcal vaccine in adults in more developed countries: the state of the evidence. **Lancet Infectious Diseases**, v. 3, p. 71-78, 2003.

MANTESE. O, C.; PAULA, A.; MORAES, A. B.; MOREIRA, T. A.; GUERRA, M. L. L. S.; BRANDILEONE, M. C. C. Prevalência de sorotipos e resistência antimicrobiana de cepas invasivas do *Streptococcus pneumoniae*. **Journal of Pediatrics**, v. 79, p. 537-542, 2003.

MICOLI, F.; RONDINI, S.; PISONI, I.; GIANNELLI, C.; DI CIOCCIO, V.; CONSTANTINO, P.; SAUL, A.; MARTIN, L. B. Production of a conjugate vaccine for *Salmonella enterica* serovar Typhi from *Citrobacter* Vi. **Vaccine**, v. 30, p. 853 – 861, 2012.

MIYAJI, E. N.; OLIVEIRA, M. L. S.; CARVALHO, E.; HO, P. L. Serotype-independent pneumococcal vaccines. **Cellular and Molecular Life Science**, v. 70, p. 3303-3326. 2013.

MORENO, A. T.; OLIVEIRA, M. L. S.; FERREIRA, D. M.; HO, P. L.; DARRIEUX, M.; LEITE, L. C. C.; FERREIRA, 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, p. 439-446. 2010.

O'BRIEN, K. L.; WOLFSON, L. J.; WATT, J. P.; HENKLE, E.; DDELORIA-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, p. 893-902, 2009.

PERCIANI, C. T.; BARAZZONE, G. C.; GOULART, C.; CARVALHO, E.; CABRERA-CRESPO, J.; CONÇALVES, V. M.; LEITE, C. C. L.; TANIZAKI, M. M. Conjugation of Polysaccharide 6B from *Streptococcus pneumoniae* with Pneumococcal Surface Protein A: PspA Conformation and Its Effect on the Immune Response. **Clinical and Vaccine Immunology**. v. 20, p. 858 – 866. 2013.

PROTEIN CALCULATOR V3.4 disponível em <
<http://protcalc.sourceforge.net/>> Acesso: 01 fev 2012.

SCOPES, R. K., **Protein Purification: Principles and Practice 3. ed.** New York: Springer Verlag, 1994. 380 p.

SENKOVICH, O.; COOK, W. J.; MIRZA, S.; HOLLINGSHEAD, S. K.; PROTASECICH, I. I.; BRILES, D. E.; CHATTOPADHAY, D.; Structure of a complex of human lactoferrin N-lobe with pneumococcal surface protein A provides insight into microbial defense mechanism. **Journal of Molecular Biology**, v. 370, p. 701–713, 2007.

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

Substech Substances and Technology. Homogenization, 2013.

Disponível em: <

<http://www.substech.com/dokuwiki/doku.php?id=homogenization>>.

Acesso em: 07 nov. 2013.

TOMANEE, P.; HSU, J. T.; ITO, Y. Fractionation of protein, RNA and plasmid DNA in centrifugal chromatography using cationic surfactant CTAB containing inorganic salts NaCl and NH₄Cl. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 8, p. 52-59, 2004.

VADESILHO, C. F. M.; FERREIRA, D. M.; MORENO, A. T.; CHAVEZ-OLORTEGUI, C.; AVILA, R. A. M.; OLIVEIRA, M. L. S. O; HO, P. L.; MIYAJI, E. N. Characterization of the antibody response elicited by immunization with pneumococcal surface protein A (PspA) as recombinant protein or DNA vaccine and analysis of protection against an intranasal lethal challenge with *Streptococcus pneumonia*. **Microbial Pathogenesis** v. 53, p. 243 – 249. 2012.

VAN STOKKUM, I. H. M.; SPOELDER, H. J. W.; BLOEMENDAL, M.; VAN GRONDELLE, R.; GROEN, F. C. A. Estimation of protein secondary structure and error analysis from CD spectra. **Analytical Biochemistry**. v. 191, p110-118, 1990.

Ward, O. P. **Bioprocessing**, New York: Van Nostrand Reinhold, 1991. 198 p.

WHITMORE, L.; WALLACE, B. A. DICHROWEB: an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. **Nucleic Acids Research** v. 32, p668-673, 2004.

World Health Organization. Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization WHO position paper. **Weekly Epidemiological Record**, v. 82, p. 93-104, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Pneumonia. 2009.

Disponível em:

<http://www.who.int/immunization_monitoring/burden/Pneumo_hib_estimates/en/index2.html>. Acesso em: 05 nov. 2013.

YANG, Y.; GENG, Y. Mixed-mode chromatography and its applications to biopolymers. **Journal of Chromatography A**. v. 1218, p. 8812-8825. 2011.