



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação Farmácia

ANA ALICE CARIZIA GUIMARÃES

EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA PSPA DE *Streptococcus pneumoniae*
UTILIZANDO SURFACTANTES IÔNICOS

Araraquara, SP

2022

ANA ALICE CARIZIA GUIMARÃES

**EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA PSPA DE *Streptococcus pneumoniae*
UTILIZANDO SURFACTANTES IÔNICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Farmacêutica.

Orientadora: Profª. Dra. Valéria de Carvalho Santos Ebinuma

Coorientador: Esp. Flávio Pereira Picheli

Araraquara, SP

2022

G963e Guimarães, Ana Alice Carizia.
Extração e purificação da proteína PspA de *Streptococcus pneumoniae*
utilizando surfactantes iônicos / Ana Alice Carizia Guimarães. – Araraquara:
[S.n.], 2022.
54 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Cursos (Graduação – Farmácia) –
Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de
Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Valéria de Carvalho Santos Ebinuma.
Coorientador: Flávio Pereira Picheli.

1. Pneumonia. 2. Proteína A de Superfície Pneumocócica (PspA). 3.
Vacina. 4. Extração. 5. Purificação. 6. Proteína Recombinante. 7. Surfactantes
Iônicos. I. Santos Ebinuma, Valéria de Carvalho, orient. II. Picheli, Flávio
Pereira, coorient. III. Título.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe Eliane Aparecida Carizia Guimarães, por sempre apoiar minhas escolhas e incentivar os meus estudos. Essa conquista é nossa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à UNESP por me proporcionar tantos aprendizados e por toda a infraestrutura para a realização deste trabalho e de todo o curso de Farmácia.

Agradeço ao Prof. Dr. Jorge Fernando Brandão Pereira pela oportunidade de entrar para o grupo de pesquisa BioPPul-DEBB e pelos ensinamentos; ao meu co-orientador Flávio Pereira Picheli por todo o suporte no laboratório e à Profa. Dra. Valéria de Carvalho Santos Ebinuma, pela orientação, por ser tão atenciosa e me incentivar a perseguir meus objetivos.

Agradeço ao Congresso *Biopartitioning and Purification Conference (BPP)* de 2019 pela oportunidade de apresentar este trabalho e aumentar exponencialmente minha admiração pela ciência, e sobretudo, pela pesquisa brasileira.

Agradeço, por fim, aos amigos que fiz nesses anos como Unespiana e que, de certa forma, me ajudaram a chegar até aqui.

RESUMO

Streptococcus pneumoniae é um importante patógeno de pneumonia e meningite. Atualmente, as vacinas disponíveis no Brasil para essas doenças se baseiam em polissacarídeos capsulares (CPS), que induzem a resposta imune timo-dependente. Porém, tais vacinas têm alto custo de produção o que resulta em baixa cobertura vacinal. Várias proteínas pneumocócicas foram identificadas como potenciais candidatas à vacina, como a *proteína A* de superfície pneumocócica (PspA), particularmente a *proteína A* de superfície do pneumococo do clado 4 (PspA4Pro). Esta, se mostrou capaz de induzir anticorpos com alta reatividade cruzada entre as diferentes PspA, ou seja, é uma candidata com maior chance de cobertura vacinal. Para a produção dessa proteína em larga escala a custos menores, que viabiliza criação de vacinas com potencial de mercado, bactérias como *Escherichia coli* são os sistemas de expressão heteróloga de PspA4Pro bastante comuns. Uma vez que a proteína PspA é produzida intracelularmente, é necessário o rompimento celular e/ou permeabilização da célula para sua recuperação, seguida por etapas de purificação e segurança biológica para então sua aplicação clínica. Dentre os processos de rompimento celular, pode-se empregar compostos anfifílicos (tensoativos) como agentes de ruptura celular alternativos e eficazes para a permeabilização e recuperação de proteínas recombinantes intracelulares de *E. coli* sem dano funcional. Neste trabalho, avaliou-se a aptidão de compostos tensoativos na recuperação de PspA4Pro de células recombinantes de *E. coli*, a saber: cloreto de tributil-1-tetradecilfosfônio ([P_{4,4,4,14}]Cl), brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB), Dodecil sulfato de sódio (SDS) e polioxietileno p-t-octil fenol (Triton X-114). Para tanto, uma porção de biomassa de *E. coli* BL21(DE3) pET37b foram homogeneizados em soluções aquosas (0,25 mol.L⁻¹) dos tensoativos durante 1 h, a 25°C e 50,0 RPM em agitador orbital. Em seguida, o extrato foi clarificado e o sobrenadante incubado em tampão de Laemmli 2:1 (v/v) com β-mercaptoetanol e, em seguida, aplicadas em eletroforese desnaturante (5% e 12% (m/m)) SDS-PAGE. Como controle positivo da extração de proteínas foi aplicado um método mecânico por sonda de ultrassom (US). Os géis foram revelados pelo corante Coomassie Brilliant Blue e escaneados pelo GelDoc® XR+ BioRad®. Os resultados mostraram que a adição dos tensoativos carregados [P_{4,4,4,14}]Cl e CTAB e o tensoativo não-iônico Triton X-114 foram eficazes para recuperar a PspA4Pro, permitindo sua pré-purificação. Assim, o método de permeabilização celular empregando tensoativos pode ser um processo potencialmente eficaz para a recuperação de proteínas recombinantes.

Palavras-chave: Pneumonia; Proteína A de Superfície Pneumocócica (PspA); Vacina; Extração; Purificação; Proteína Recombinante; Surfactantes Iônicos.

ABSTRACT

Streptococcus pneumoniae is an important pathogen of pneumonia and meningitis. Currently, vaccines available in Brazil for these diseases are based on capsular polysaccharides (CPS), which induce a thymus-dependent immune response. However, such vaccines have a high production cost, which results in low vaccine protection. Pneumococcal proteins were identified as potentially cross-linked protein to the vaccine, especially the pneumococcal surface *protein A* (PspA), particularly, pneumococcal surface *protein A* for 4th clade, PspA4Pro, that proved be capable of producing high reactivity between the different PspA is, since it is a candidate with a greater chance of vaccine coverage. For the production of this protein on a large scale at lower costs, which makes it possible to create vaccines with market potential, bacteria such as *Escherichia coli* are the very common heterologous expression systems of PspA4Pro. Once the PspA protein is produced intracellularly, cell disruption and/or cell permeabilization is necessary for its recovery, followed by purification and biological safety steps for its clinical application. Among the cell disruption processes, amphiphilic compounds (surfactants) can be used as alternative and effective cell disruption agents for permeabilization and recovery of intracellular recombinant proteins of *E. coli* without functional damage. In this work, the ability of surface-active compounds to recover PspA4Pro from recombinant *E. coli* biomass was evaluated, namely: tributyl-1-tetradecylphosphonium chloride ([P_{4,4,4,14}]Cl), hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB), sodium dodecyl sulfate (SDS) and polyoxyethylene p-t-octyl phenol (Triton X-114). For that, a portion of *E. coli* BL21(DE3) pET37b biomass was homogenized in aqueous solutions (0.25 mol.L⁻¹) of the surfactants for 1 h, at 25°C and 50.0 RPM in an orbital shaker. Following, the extract was clarified and the supernatant was incubated in Laemmli buffer 2:1 (v/v) with β-mercaptoethanol and then applied in denaturing electrophoresis (5% and 12% (w/w)) SDS- PAGE As a positive control of protein extraction, a mechanical method by ultrasound probe (US) was applied. Gels were developed by Coomassie Brilliant Blue stain and scanned by GelDoc® XR+ BioRad®. The results showed that the addition of the charged surfactants [P_{4,4,4,14}]Cl and CTAB and the non-ionic surfactant Triton X-114 were effective in recovering PspA4Pro, allowing its pre-purification. Thus, the cell permeabilization method employing surfactants can be a potentially effective process for the recovery of recombinant proteins.

Keywords: Pneumonia; Pneumococcal Surface Protein A (PspA); Vaccine; Extraction; Purification; Recombinant Protein; Surface Active Ionic Compounds.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação estrutural da superfície de pneumococo (Adaptado de Figueiredo, 2014).	17
Figura 2. Fluxograma de produção de uma vacina.	22
Figura 3. Preparo das soluções aquosas Fonte: autora.	29
Figura 4. Fluxograma com as etapas de rompimento celular.	30
Figura 5. Equipamentos para execução da eletroforese SDS-PAGE.	35
Figura 6. Gel de eletroforese SDS-PAGE com: M.W.) Padrão de peso molecular proteico BLUeye da Sigma™; A) extrato de proteína bruta após extração com solvente (obtida após clarificação por [P _{4,4,4,14}]Cl); B) extrato de proteína bruta após extração com ultrassom;	36
Figura 7. Densitograma com perfil de bandas e análise da abundância relativa da banda (%) do gel de eletroforese SDS-PAGE de: M.W.) Padrão de peso molecular proteico BLUeye da Sigma™; A) extrato de proteína bruta após extração com solvente (obtido após clarificação por [P _{4,4,4,14}]Cl); B) extrato de proteína bruta de extração assistida por ultrassom.	37
Figura 8. Densitograma com perfil de bandas e análise da abundância relativa da banda (%) do gel de eletroforese SDS-PAGE de: C) extrato de proteína bruta após extração de NaCl com alta pressão osmótica; D) extrato de proteína bruta após extração com solvente (obtido após clarificação por CTAB); E) extrato de proteína bruta após extração com solvente (obtido após clarificação por SDS).	37
Figura 10. Gel de eletroforese SDS-PAGE com: M.W.) Padrão de peso molecular proteico BLUeye da Sigma™; A-top) extrato de proteína da fase rica em PPG-400 (topo) do sistema SDFA PPG-400/[Ch]Cl (obtido após clarificação por ultrafiltração a 10.000 kDa para remover [P _{4,4,4,14}]Cl); A-bottom) extrato de proteína da fase rica em [Ch]Cl (parte inferior) do SDFA PPG-400/[Ch]Cl (obtido após clarificação por ultrafiltração a 10.000 kDa para remover [P _{4,4,4,14}]Cl); B-top) extrato de proteína da fase rica em PPG-400 (topo) do SDFA PPG-400/[Ch]Cl (obtido da extração assistida por ultrassom); B-bottom) extrato de proteína presente da fase rica em [Ch]Cl (inferior) do SDFA PPG-400/[Ch]Cl (obtido da extração	

assistida por ultrassom; **A*-top**) extrato de proteína concentrado da fase rica em PPG-400 (topo) do SDFA PPG-400/[Ch]Cl ABS (obtida após 2x ultrafiltração a 10.000 kDa para remover [P_{4,4,4,14}]Cl); **A*-bottom**) extrato de proteína concentrado da fase rica em [Ch]Cl (fundo) do SDFA PPG-400/[Ch]Cl (obtido após 2x ultrafiltração a 10.000 kDa para remover [P_{4,4,4,14}] Cl).41

Figura 11. Gel de electroforese SDS-PAGE com: **M.W.**) Padrão de peso molecular proteico BLUeye da Sigma™; **F**) extrato de proteína bruta após extração com solvente (obtida após clarificação por Triton X-114. Aplicações de amostras a 1,0 mg/mL (por 280 nm) em poço de 10 uL.42

Figura 12. Gel de electroforese SDS-PAGE com: **M.W.**) Padrão de peso molecular proteico BLUeye da Sigma™; **D-45'**) extrato de proteína bruta após extração de 45 min com solvente (obtida após clarificação por CTAB); **D-30'**) extrato de proteína bruta após extração de 30 min com solvente (obtida após clarificação por CTAB); **e D-15'**) extrato de proteína bruta após extração de 15 min com solvente (obtida após clarificação por CTAB).....43

Figura 13. Gel de electroforese SDS-PAGE com: **M.W.**) Padrão de peso molecular proteico BLUeye da Sigma™; **D-45'**) extrato de proteína bruta após extração de 45 min com solvente (obtida após clarificação por Triton X-114); **D-30'**) extrato de proteína bruta após extração de 30 min com solvente (obtida após clarificação por Triton X-114); **e D-15'**) extrato de proteína bruta após extração de 15 min com solvente (obtida após clarificação por Triton X-114).43

Figura 14. Gel de electroforese SDS-PAGE com: **M.W.**) Padrão de peso molecular proteico BLUeye da Sigma™; **D-45'**) extrato de proteína bruta após extração de 45 min com solvente (obtida após clarificação por [P_{4,4,4,14}]Cl e posterior 2x ultrafiltração a 10.000 kDa para remover [P_{4,4,4,14}]Cl); **D-30'**) extrato de proteína bruta após extração de 30 min com solvente (obtida após clarificação por [P_{4,4,4,14}]Cl e posterior 2x ultrafiltração a 10.000 kDa para remover [P_{4,4,4,14}]Cl); **e D-15'**) extrato de proteína bruta após extração de 15 min com solvente (obtida após clarificação por [P_{4,4,4,14}]Cl e posterior 2x ultrafiltração a 10.000 kDa para remover [P_{4,4,4,14}]Cl).44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição dos métodos de rompimento celular, adaptado de Vitolo (2015) e Kilikian e Pessoa Jr (2005).	19
Tabela 2. Características dos solventes empregados no presente estudo.....	27
Tabela 3. Composição da curva de calibração para determinação de proteínas totais	30
Tabela 4. Composição do gel de eletroforese SDS-PAGE.	32
Tabela 5. Informação sobre os valores de concentração micelar crítica dos surfactantes.	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
(m/v)	razão massa/volume
[Ch]Cl	cloreto de colina
[P _{4,4,4,14}]Cl	cloreto de tributil-1-tetradecilfosfônio
°C	graus Celsius
μL	microlitro
μg	micrograma
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (albumina sérica bovina)
CMC	concentração micelar crítica
CPS	Polissacarídeo capsular
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio
Da	Dalton (unidade de massa atômica)
DATASUS	Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
g	grama
h	horas
KDa	<i>KiloDalton</i> = 10^3Da
kHz	quilohertz
mA	miliAmpère
min	minuto
mol.L ⁻¹	concentração molar
mL	mililitro
NaCl	Cloreto de sódio

nm	nanômetros
PCV7	Vacina conjugada 7-valente
PCV10	Vacina conjugada 10-valente
PCV13	Vacina conjugada 13-valente
pH	potencial hidrogeniônico
PPG-400	polipropilenoglicol
PPV23	Vacina não conjugada 23-valente
PspA	Proteína A de superfície de pneumococo
PspA4Pro	Proteína A de superfície do pneumococo do clado 4
q.s.p.	quantidade suficiente para
Rpm	rotações por minuto
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
SDFA	sistema de duas fases aquosas
SDS	dodecilsulfato de sódio
SDS-PAGE	dodecilsulfato de sódio – Eletroforese em gel de poliacrilamida
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
Triton X-114	polioxietileno p-t-octil fenol
US	ultrassom
UV	ultravioleta visível
V	volts

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1. <i>Streptococcus pnemunoniae</i> e proteína A de superfície do pneumococo	16
2.2. Métodos de extração.....	18
2.3. Surfactantes	20
2.4. Rompimento celular	20
2.5. Vacinas pneumocócicas.....	21
2.6. Cenário regulatório de produtos biológicos no Brasil	23
3. OBJETIVOS	24
4. MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1. Materiais	25
4.2. Preparo das soluções	29
4.3. Metodologia de rompimento celular.....	29
4.4. Validação da metodologia de determinação de proteínas	30
4.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante SDS-PAGE.....	32
4.6. Sistema Duas Fases Aquosas (SDFA)	33
4.7. Ultrafiltração	33
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante – SDS-PAGE.....	34
5.2. Rompimento celular	35
5.3. Sistema de duas fases aquosas (SDFA).....	40
5.4. Ultrafiltração	40
6. CONCLUSÃO.....	45
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
8. ANEXOS.....	52

1. INTRODUÇÃO

Streptococcus pneumoniae é um importante patógeno causador de pneumonia, bacteremia, sepse e meningite. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), estas estão entre os maiores problemas de saúde pública do mundo, de maior incidência e mortalidade em países subdesenvolvidos, acometendo especialmente indivíduos imunocomprometidos, idosos com mais de 65 anos e crianças de até 5 anos (FIGUEIREDO, 2014).

As vacinas pneumocócicas disponíveis atualmente são constituídas de polissacarídeos capsulares (CPS) livres ou conjugados a proteínas carreadoras, que os transforma em antígenos que induzem mudança da resposta imune timo-independente para timo-dependente. Porém, as vacinas utilizadas possuem, além do alto custo, uma baixa cobertura vacinal de sorotipos – a *S. pneumoniae* possui cerca de 91 diferentes sorotipos, e as vacinas atuais cobrem até 23 sorotipos, evidenciando a necessidade de ampliação desta cobertura (OLIVEIRA et al., 2012). Em 2013, de acordo com dados do Programa Nacional de Imunização, o Ministério da Saúde adquiriu 11 milhões de doses da vacina PVC10 ao custo unitário de R\$33,01. E em agosto de 2016, dados da Lista de Preços e Medicamentos (CMED) demonstram que a vacina PCV13 e a PPSV23 tiveram como custo unitário, respectivamente, R\$155,35 e R\$43,64 para o Sistema Único de Saúde (ALEXANDRE, 2016).

No Brasil já há investigação para o desenvolvimento de vacina pneumocócica conjugada de CPS a proteínas do próprio pneumococo, as quais permitiriam aumentar a cobertura vacinal (FIGUEIREDO, 2017). Embora o polissacarídeo capsular forme uma variedade de sorotipos, as proteínas de superfície são menos variáveis. Dentre estas proteínas, se destaca a Proteína A de Superfície do Pneumococo (PspA), que possui importante fator de virulência, conferindo resistência ao pneumococo contra os tratamentos existentes, sendo este medicamentoso, com antimicrobianos e demais medicações para alívio de sintomas.

Embora a produção de vacinas seja ainda bastante desafiadora, a complexidade da obtenção está relacionada com as etapas de purificação dos componentes de uma vacina, variando de 20% a 80% do custo total do produto (FIGUEIREDO, 2014). Estas etapas assumem extrema importância no processo de manufatura das mesmas, uma vez que uma purificação adequada enriquece o produto da molécula de interesse e elimina componentes indesejados, e principalmente, porque a alta pureza das vacinas é uma exigência dos órgãos

regulatórios. Para tanto, considerando que o antígeno de interesse é produzido de forma intracelular em *Escherichia coli* recombinante, o primeiro passo após a produção consistirá na sua extração. Tradicionalmente, esta é realizada por ultrassom, ou homogeneizador de alta pressão, duas técnicas de rompimento celular mecânico com capacidade de romper diversos tipos celulares, sejam Gram positivos ou Gram negativos (VITOLLO, 2015).

A possibilidade de métodos alternativos de rompimento celular que permitam permeação seletiva e evite a degradação das biomoléculas é interessante por agregar efeitos extrativos em uma única etapa, podendo diminuir a quantidade de contaminantes presentes. Para tal, alguns estudos se utilizam de soluções aquosas de surfactantes anfifílicos monitorando sua capacidade de recuperar a proteína do ambiente intracelular sem causar dano estrutural ou funcional significativo na biomolécula de interesse. Estudos comparativos sobre as metodologias de rompimento celular utilizando surfactantes (MARTINS et al., 2018), demonstraram que os tensoativos catiônicos podem ser utilizados como metodologia efetiva no rompimento da membrana celular de *E. coli*, pois possuem longas cadeias alquílicas capazes de desestruturar a membrana. Neste caso, a carga eletronegativa do ânion consegue atrair parcialmente os elétrons envolvidos nessa ligação, neutralizando a carga positiva do tensoativo e reduzindo a polaridade do mesmo, o que consequentemente reduz a solubilidade em água dos tensoativos catiônicos (DALTIM, 2011). A membrana celular sofre expansão de sua bicamada lipídica, permitindo permeabilização celular pelo surfactante e liberando seu material intracelular.

A utilização dos surfactantes iônicos torna o processo mais sustentável e seguro, visto que contrariamente aos processos que utilizam solventes orgânicos voláteis, não há a emissão de compostos orgânicos potencialmente tóxico ou contaminantes para a atmosfera (ORR et al., 2015), sendo assim ambientalmente mais favoráveis. Ainda comparando processos de purificação iniciais, o método mecânico demanda maior tempo de processamento, geralmente com alto consumo de energia e maior risco alterações funcionais ou espaciais das biomoléculas. O trabalho de Martins et al. (2018), demonstra a boa capacidade do surfactante catiônico cloreto de tributil-1-tetradecilfosfônio ($[P_{4,4,4,14}]Cl$) na liberação de proteína verde fluorescente (GFP) do meio intracelular de células de *E. coli*, com índices melhores que os métodos de extração ultrassônica.

Adicionalmente, os surfactantes podem ser utilizados ainda na formação de sistemas micelares de duas fases aquosas (SDFA), os quais podem ser plataformas alternativas e de

baixo custo para a separação e purificação de proteínas. Particularmente, a adição de surfactantes iônicos na formação de SDFA permite controlar o equilíbrio hidrofílico-lipofílico das micelas, sendo facilmente integrados nas mesmas se adicionados acima da concentração micelar crítica (CMC). Este processo, aliado ao controle da temperatura, possibilita a recuperação seletiva da proteína de interesse a partir do lisado celular, no qual as biomoléculas são fracionadas entre as duas fases, uma das quais enriquecida com a macromolécula-alvo, neste projeto a proteína PspA (MARTINS et al., 2018).

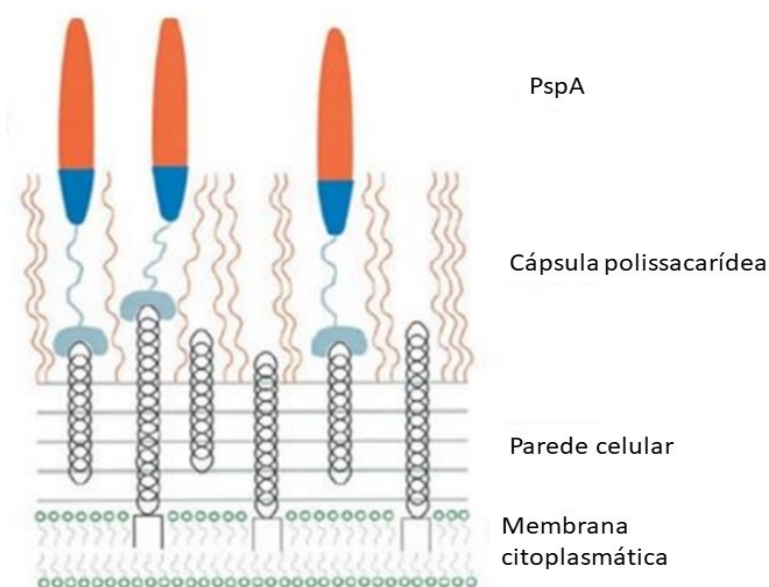
Considerando a capacidade dos surfactantes catiônicos no rompimento de células *E. coli*, (MARTINS et al., 2018) e a possibilidade de integração com etapas posteriores de extração e purificação da GFP utilizando SDFA (DOS SANTOS et al., 2018), o presente projeto teve a finalidade de estudar e testar a aplicação de SDFA na extração da proteína PspA heteróloga advindas da biomassa de *E. coli*. Este trabalho visou reduzir não somente o custo final da vacina, mas também, aperfeiçoar técnicas para ampliar sua aplicação, visando maior cobertura vacinal para os sorotipos patogênicos do pneumococo.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. *Streptococcus pneumoniae* e proteína A de superfície do pneumococo

O patógeno bacteriano *S. pneumoniae* é uma diplococo Gram-positivo, encapsulado, anaeróbico causador de doenças de alta morbidade e mortalidade, como por exemplo, otite média aguda, pneumonia, meningite e sepse. Isolado pioneiramente em 1881 por Louis Pasteur e George Sternberg, o pneumococo vem sendo um dos microrganismos mais estudados desde então (MORENO, 2010; ALONSODEVELASCO et al., 1995). A superfície do pneumococo se divide em três estruturas: a cápsula polissacarídica (CPS), a parede celular e a membrana plasmática, representadas na Figura 1. A CPS atua como principal fator de virulência da bactéria, protegendo-a da fagocitose promovida pela resposta celular dirigida pelo sistema imune do hospedeiro. A cápsula pode ter variações na composição e estrutura química, e já foram identificados mais de 90 sorotipos (KADIOGLU et al., 2008).

Figura 1. Representação estrutural da superfície de pneumococo (Adaptado de Figueiredo, 2014).



Fator de virulência é uma característica fenotípica envolvida com a capacidade relativa de um microrganismo causar dano a um determinado hospedeiro. Dentre os fatores de virulência dos pneumococos, tem-se as proteínas de superfície. Considerada a macromolécula biológica mais abundante, uma proteína se caracteriza como um polímero de aminoácidos, com um carbono assimétrico (carbono alfa) ligado ao grupo amino e à carboxila. Os aminoácidos, quando se unem, sofrem reação de condensação e formam ligação amida, comumente chamada de ligação peptídica, gerando polipeptídeos e proteínas (LEHNINGHER, 2014). As proteínas de superfície que ficam ancoradas na parede bacteriana, com parte exposta na superfície da cápsula.

A proteína de superfície A de pneumococo (PspA) é um importante fator de virulência presente em todos os isolados descritos de *S. pneumoniae*, com variabilidade antigênica, realizando a interação entre o patógeno e o hospedeiro (MCDANIEL et al., 1994). A PspA possui uma região N-terminal, polar e negativamente carregada, repelindo as também eletronegativas moléculas da cápsula, e tal interação é capaz de impedir a fagocitose da célula bacteriana pelo hospedeiro, provando seu papel de virulência. A mesma região protege o pneumococo de morte por apolactoferrina nas mucosas – lactoferrina (glicoproteína transportadora de ferro, liberada por leucócitos no processo inflamatório) livre de metais com efeito bacteriostático e bactericida (REN, 2004; SHAPER 2004, TAI 1993).

De fácil manipulação genética, a bactéria *E. coli* tem sido o procarioto mais comumente utilizado para a produção industrial de proteínas recombinantes em grande quantidade e baixo custo, quando comparada com outras plataformas de expressão (BAESHEN et al., 2015). Sua capacidade de acumular grande massa de proteínas em seu interior, e suportar uma alta variação nas condições ambientais enquanto apresenta rápido crescimento deu-lhe papel de destaque como hospedeira, por produção intracelular, de proteínas recombinantes. (DEMAIN, 2009). Dentre os sistemas de expressão por indução, destaca-se o sistema pET como o mais utilizado para a clonagem e expressão de proteínas recombinantes, sendo a proteína de interesse clonada para que linhagens de *E. coli* sejam transformadas com o plasmídeo (SORENSEN, 2005).

2.2. Métodos de extração

Após o cultivo microbiano, é necessário fazer as etapas de extração/purificação para recuperação da biomolécula de interesse. O primeiro processo é a clarificação do meio que pode ser por centrifugação ou filtração para separar o meio líquido da célula. Caso a biomolécula de interesse seja extracelular o extrato recuperado segue para as próximas operações unitárias, caso contrário, ou seja, a molécula seja intracelular, é necessário realizar o rompimento/permeabilização da célula (KILIKIAN, PESSOA JR, 2005). Uma série de biomoléculas de importância para a indústria farmacêutica e alimentícia são produzidos intracelularmente por microrganismos. Assim, há a necessidade de rompimento/permeabilização celular para recuperar esses compostos da biomassa microbiana. Os métodos de rompimento celular se dividem em quatro classes, descritos na Tabela 1, sendo: métodos mecânicos, não mecânicos ou físicos, químicos e enzimáticos (HARRIS et al., 1995).

Tabela 1. Descrição dos métodos de rompimento celular, adaptado de Vitolo (2015) e Kilikian e Pessoa Jr (2005).

Classes	Exemplos	Vantagens	Desvantagens
Métodos mecânicos	Ultrassom	Utilização de pouco solvente, menor tempo de processo	Possível degradação das biomoléculas pelo aumento da temperatura
	Homogeneizadores de alta pressão	A alta pressão aumenta o rendimento de recuperação das biomoléculas de interesse sem danificá-las	Possíveis inconstâncias nos parâmetros: tipo de célula, velocidade de alimentação, pressão, temperatura e concentração celular
	Moinho de bolas	Condições de rompimento fáceis de serem controladas	Depende da câmara de rompimento e tamanho das esferas
	Prensa francesa	Rompimento total da célula, extrusão por pressão	Difícil aplicação em larga escala (processo com volumes pequenos)
Métodos não mecânicos ou físicos	Choque osmótico	Propicia a permeabilização seletiva, liberando as moléculas alvo	Inadequado para bactérias Gram negativas que já possuem pressão osmótica interna
	Congelamento / descongelamento	Ruptura celular causada pela formação de cristais de gelo	Processo lento, de difícil produção em larga escala
Métodos químicos	Detergentes	Dissociam proteínas e lipídios da parede celular, formando poros que liberam a molécula alvo	Pode formar espumas, desnaturar ou precipitar proteínas
	Solventes orgânicos	Método simples, de baixo custo e fácil ampliação em larga escala	Geração de poluentes
Métodos enzimáticos	Inibição da síntese da parede celular	Boa recuperação de biomoléculas sensíveis à temperatura, tensão de cisalhamento e pressão	Possível presença de inibidores
	Lise enzimática	Fácil controle do pH e da temperatura, especificidade alta para degradação da parede celular	Alto custo da enzima

Sendo possível evitar a desnaturação das proteínas, sendo estas as moléculas alvo, utilizar o método químico com surfactantes ou detergentes para a extração intracelular demonstra ser uma promissora alternativa.

2.3. Surfactantes

Surfactantes ou tensoativos são moléculas anfífilas compostas por uma porção hidrofílica (cabeça polar) e uma porção hidrofóbica (corpo apolar) que diminuem a tensão superficial, o fio de moléculas coesas na superfície de um líquido. Esses compostos são capazes de realizar lise celular, extração de proteínas da membrana e solubilização de biomoléculas. Em especial, as bactérias Gram positivas possuem suas paredes celulares mais rígidas do que as Gram negativas, o que as torna mais difíceis de serem rompidas. Os usos de métodos mecânicos, no entanto, podem degradar as proteínas de interesse, além de possuir alto custo de processamento. Dessa forma, a liberação dos produtos intracelulares feita por rompimento celular de método químico, com surfactantes, pode ser uma alternativa altamente positiva, visto que a interação entre os compostos anfífilos e a membrana celular provoca a sua expansão e, conseqüentemente, permeabilização e liberação da proteína de interesse (VITOLLO, 2015).

Os tensoativos, espontaneamente, se associam em solução aquosa a partir de uma determinada concentração, a concentração micelar crítica (CMC). Acima da CMC, as moléculas do tensoativo formam grandes agregados moleculares de dimensões coloidais, chamados de micelas, que geralmente possuem de 60 a 100 moléculas do tensoativos. A CMC depende da estrutura do tensoativo (tamanho da cadeia do hidrocarboneto) e das condições do meio (concentração iônica, contra-íons, temperatura, etc) (MORAES; REZENDE, 2004).

2.4. Rompimento celular

O rompimento celular permite que ocorra a liberação não somente da molécula-alvo, mas também fragmentos celulares contaminantes e indesejados. Então, após esse processo é necessário remover esses compostos indesejados usando técnicas como centrifugação, filtração ou extração líquido-líquido, que aumentam o custo do processo. Biomoléculas com aplicações médicas exigem alto nível de pureza (~99%) requerendo complexos processos de purificação, resultando em produtos finais caros e inacessíveis ao público em geral. Por isso, é necessário a otimização e desenvolvimento de técnicas de purificação que sejam

sustentáveis e com menor custo, a fim de que o processo seja realizado em larga escala (YANG, 2011; DAS, 2014).

Assim, após o rompimento celular e recuperação da molécula de interesse, a fim de se extrair contaminantes com características físico-químicas diferentes da molécula-alvo, pode-se empregar a extração líquido-líquido composta por polímeros/tensoativos, os chamados Sistemas de Duas Fases Aquosas (SDFA). Esses sistemas formam duas fases aquosas imiscíveis, mantendo alto teor aquoso (cerca de 75%) para garantir manutenção biológica das proteínas de interesse. A separação é feita, então, pelas diferentes solubilidades nas fases líquidas, considerando a massa molar, carga elétrica e hidrofobicidade, características superficiais das proteínas. SDFA podem ser formados com polímeros e/ou agentes tensoativos em uma única solução, e a utilização de polímeros como polipropilenoglicol (PPG) e sais como cloreto de colina ([Ch]Cl) apresentam rápida separação de fases e maior seletividade na separação das moléculas. Tais propriedades são excelentes para o uso industrial, com baixa toxicidade e, por consequência, melhores condições de manuseio e trabalho, quando comparada aos solventes orgânicos - que podem ser tóxicos, voláteis e/ou inflamáveis, além de inadequados para a extração com proteínas por promover sua desnaturação (JOHANSSON, 2018; QUENTAL, 2015; ERICKSON, 2012; CHAN, 1991; DEBENEDICTS, 2016).

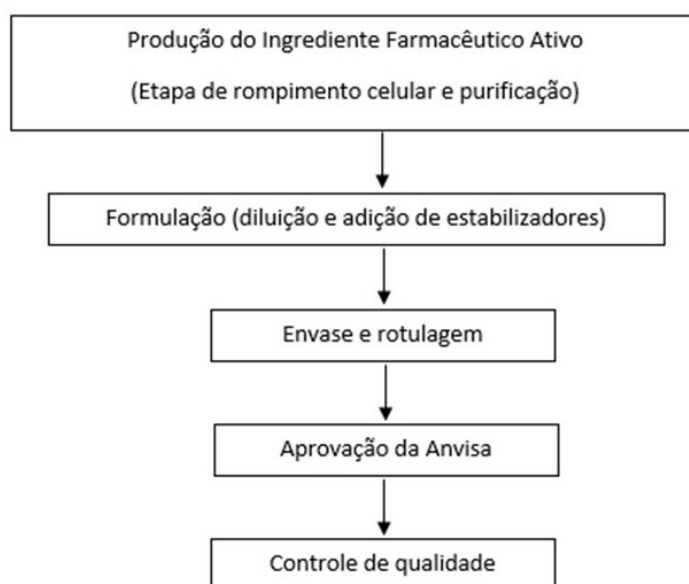
No caso específico deste tipo de sistema, a separação em duas fases ocorre com o aumento da concentração dos surfactantes até a formação de micelas, para então aumentar a temperatura do sistema e fracioná-lo, com fase inicialmente a superior rica em proteína PspA purificada; e fase inferior, rica em contaminantes. É esperada, portanto, a manutenção da estrutura da PspA com o SDFA, visto que as concentrações dos líquidos são baixas e mais adequadas para a manutenção da estabilidade da proteína, o que é capaz de evitar sua precipitação ou alteração estrutural, as já citadas desvantagens que podem ocorrer com o método químico de extração com surfactantes (JOHANSSON, 2008; PERSSON, 1999).

2.5. Vacinas pneumocócicas

Por definição, vacinas são medicamentos imunobiológicos que contêm uma ou mais substâncias antigênicas que, quando inoculadas, são capazes de induzir imunidade específica ativa, a fim de proteger contra, reduzir a severidade ou combater a(s) doença(s) causada(s) pelo agente que originou o(s) antígeno(s) (BRASIL, 2017).

O processo de produção de uma vacina é composto por três grandes etapas, sendo: produção do concentrado antigênico, formulação e processamento final. Na primeira etapa, são feitos estudos acerca do antígeno e as melhores maneiras de introduzi-lo ao organismo humano; já a etapa de formulação há a adição de conservantes (evitam sua contaminação), estabilizantes (impede relação entre os componentes), e adjuvantes (estimulam as células imunológicas na aplicação).

Figura 2. Fluxograma de produção de uma vacina.



A doença pneumocócica apresenta variações epidemiológicas com o tempo e localidade geográfica, o que alerta para a necessidade um monitoramento dos sorotipos atuantes e o padrão de resistência antimicrobiana para melhor estratégia terapêutica e de controle epidemiológico. (YOSHIOKA et al., 2011; HAUSDORFF et al., 2000). Segundo a OMS, estas doenças constituem um dos maiores problemas de saúde pública do mundo. Estima-se que no ano 2000 houve cerca de 14,5 milhões de episódios de doenças graves causadas pelo pneumococo, resultando em 826.000 mortes de crianças até 5 anos (O'BRIEN et al., 2009).

Dados da Organização Mundial de Saúde de 2015 estimam dentre as 5.38 milhões de mortes mundiais em crianças com idade inferior a 5 anos, 294.000 foram causadas por infecções pneumocócicas. Também, publicações da OMS em conjunto com o Instituto de Métricas de Saúde e Avaliação (IHME) estimam que, em 2017, cerca de 405.835 adultos de 50 a 69 anos morreram em todo o planeta por infecção respiratória pneumocócica, sendo 203.104 casos atribuídos à *S. pneumoniae*; e em adultos acima de 70 anos, o número de mortes globais aumenta para 1.129.372, sendo que 456.096 casos se deram pelo mesmo

pneumococo. Já para meningite pneumocócica, no mesmo ano, estimou-se que 5.395 adultos entre 50 a 69 anos, e 4.206 acima dos 70 anos, morreram (OMS, 2019).

No Brasil, no período entre 2000 e 2008, a média anual de meningite pneumocócica foi de 1.218 casos, 11% dos casos de meningite bacteriana registrados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), com uma média de letalidade de 30%. Neste período, 7.129.291 internações por pneumonias foram registradas, sendo 45% em crianças até 5 anos de idade, representando uma frequência média anual de 2.100 internações/100.000 habitantes (Ministério da Saúde – Proposta para introdução da vacina pneumocócica PCV-10 no calendário de vacinação da criança), comprovando que a pneumonia é a principal razão de hospitalização infantil (DATASUS). Dados de 2005 estimam que *S. pneumoniae* causaria mais de 40.000 mortes anuais no país, com mais de 300 casos de sepse, 370.000 casos de otite média e 150.000 casos de pneumonia, representando custos de mais de US\$240 milhões (CONSTENLA, 2008). Entre 2010 e 2018, dados do SINAN estimam-se que a incidência média de meningite pneumocócica no país foi em torno de 1.100 casos por ano com cerca de 30% de mortalidade.

Há quatro tipos de vacinas sendo comercializadas internacionalmente:

- a) Vacina 23-valente (PPV23) não conjugada, e sim, com polissacarídeos livres;
- b) Vacina 7-valente (PCV7) com proteína conjugada;
- c) Vacina 10-valente (PCV10) com proteína conjugada;
- d) Vacina 13-valente (PCV13) com proteína conjugada.

A conjugação da proteína à cápsula polissacarídica, é capaz de se converter de um antígeno indutor de resposta imune timo-independente para timo-dependente, portanto, capaz de conferir resposta imune de memória imunológica, que garante a proteção vacinal (DELVES, 2004).

2.6. Cenário regulatório de produtos biológicos no Brasil

Em 23 de dezembro de 1976, foi publicada a Lei nº 6.360, hoje revogada, que estabeleceu pela primeira vez que todos os produtos destinados à saúde devem possuir registro para fabricação, comercialização, importação e distribuição no Ministério de Saúde, considerando como produtos biológicos as vacinas e soros, bem como estabeleceu as primeiras exigências de Boas Práticas de Fabricação (BPF). Em 1995, a Portaria SVS/MS nº

16, de 06 de março, publicou as primeiras diretrizes de controle de qualidade, seguindo recomendações da OMS. (BRASIL, 1976; BRASIL, 1995). Para tanto, tem-se a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) que é uma legislação da Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) que determina as normas para estabelecimentos de assistência à saúde funcionarem com segurança.

Publicada em 2001, a RDC nº 134 de 13 de junho, e hoje revogada, trouxe as principais diferenças de produção dos produtos biológicos em comparação aos produtos fármacos-químicos, auxiliando na validação analítica dos produtos biológicos, considerando sua variabilidade intrínseca e consequente degradação de subprodutos, exigindo maior criticidade no cumprimento das BPF. Em 2002, foi publicada a RDC nº 80, de 18 de março de 2002, definindo o registro para produtos biológicos com obrigatoriedade de apresentação de estudos pré-clínicos e clínicos completos, e para revalidação destes mesmos registros, deveriam ser apresentados relatórios de farmacovigilância (BRASIL, 2001; BRASIL, 2002).

Desde então, novas atualizações regulatórias vêm surgindo, impondo maiores exigências ao processo. Em 2005, a RDC nº 315, de 26 de outubro, hoje também revogada, exigia a validação do processo de fabricação e de transporte de matérias-primas e produtos acabados. Já em 2010 foi publicada a RDC nº 17, de 16 de abril, atualmente vigente, harmonizando as práticas de boas práticas de fabricação no Mercosul, estabelecendo os requisitos mínimos para padronizar a sua verificação em inspeções sanitárias. Em coerência, no mesmo ano foi publicada a RDC nº 55, de 16 de dezembro, também vigente, estabelecendo todos os requisitos mínimos para o registro de produtos biológicos no país, como os documentos e comprovações necessárias a serem apresentadas à Anvisa, visando garantir a qualidade, a segurança e a eficácia dos mesmos (BRASIL, 2005; BRASIL, 2010).

3. OBJETIVOS

O objetivo geral do projeto foi estudar a extração do antígeno PspA4Pro utilizando soluções aquosas dos surfactantes iônicos dodecilsulfato de sódio (SDS), brometo de hexadeciltrimetilamio (CTAB), cloreto de tributil-1-tetradecilfosfônio ($[P_{4,4,4,14}]Cl$) e também do surfactante não iônico polioxietileno p-t-octil fenol (Triton X-114).

Para cumprir a meta principal deste estudo, definiram-se os seguintes objetivos específicos:

- Validar as técnicas de quantificação de proteínas totais, pelo método colorimétrico de Bradford e leitura direta em UV (280nm);
- Avaliar o rompimento celular, comparando os métodos mecânicos convencionais (ultrassom utilizando tampão fosfato) com os métodos químicos, utilizando os quatro surfactantes e comparando com o cloreto de potássio (controle negativo por pressão osmótica);
- Integrar a plataforma de rompimento celular utilizando surfactantes, com uma etapa posterior de purificação, utilizando SDFA;
- Avaliar a extração seletiva de proteínas analisando perfil de bandas em eletroforese SDS-PAGE em condições desnaturantes.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

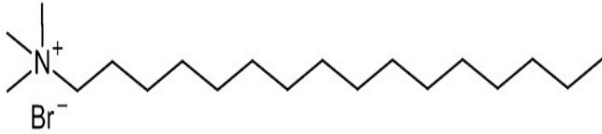
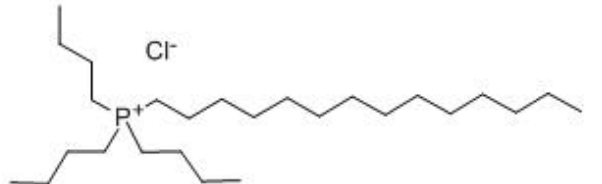
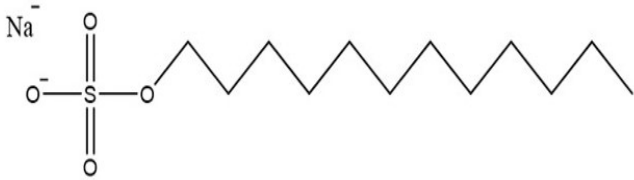
A biomassa ECP510 de *E. coli* BL21(DE3) contendo o plasmídeo pET37b codificando o gene para expressão da proteína recombinante PspA4Pro, foi produzida em meio de cultura Luria-Bertani a 31°C e 150 rpm. Após 9 horas de incubação e indução com lactose (20 g/L), e mais 16 horas de indução da produção da proteína de interesse, o pellet resultante da centrifugação contendo as células e a PspA4Pro, pesando 51,3g, foram congeladas em -80°C. A biomassa foi gentilmente cedida pela Dra. Profa. Teresa Cristina Zangirolami do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

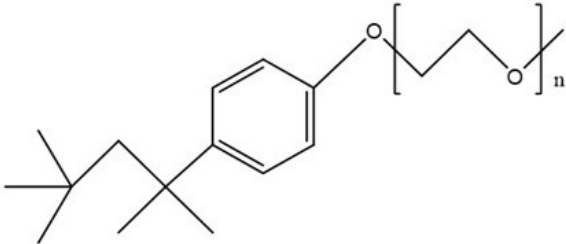
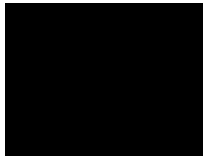
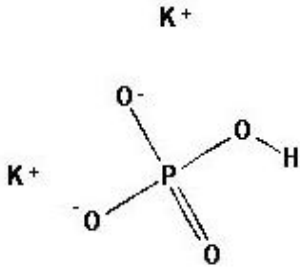
Os surfactantes iônicos CTAB, SDS e o surfactante não iônico Triton X-114, juntamente com os materiais do SDFA, sal cloreto de colina [Ch]Cl e polímero polipropilenoglicol (PPG-400) foram adquiridos da Sigma-Aldrich® (St. Louis, US). A solução branca de cloreto de sódio (NaCl) foi adquirida da Neon® (São Paulo, Brasil), e os reagentes do tampão fosfato, composto por fosfato de potássio monobásico anidro (KH₂PO₄) e fosfato de potássio dibásico anidro (K₂HPO₄), foram adquiridos da Êxodo® (São Paulo, Brasil) e Merck® (Darmstadt, DE), respectivamente. O surfactante iônico [P_{4,4,4,14}]Cl foi adquirido da Iolitec® (Heilbronn, DE), e a proteína BSA (albuma sérica bovina) da Inlab® (São Paulo, Brasil).

Para o preparo de todas as soluções aquosas de surfactantes a 0,25 mol.L⁻¹, foi utilizada água ultrapurificada por sistema de purificação Millipore tipo Milli-Q (Belford,

MA), a balança analítica Shimadzu® modelo AUY 220. Para a etapa de rompimento celular, foi utilizado o homogeneizador horizontal North Científica® NH2200, a centrífuga Hettich® Universal 320R, o ultrassom Eco-sonics® Ultronique. Para quantificação de proteínas, foram utilizados o espectrofotômetro Genesys® 10S Thermo UV-Vis e o leitor de placas EnSpire® Perkin Emer, modelo *multimode plate reader*. Os concentradores Vivaspin™ 6 e 500 10.000 MWCO (GE Healthcare®) foram utilizados na etapa de ultrafiltração da PspA.

Tabela 2. Características dos solventes empregados no presente estudo.

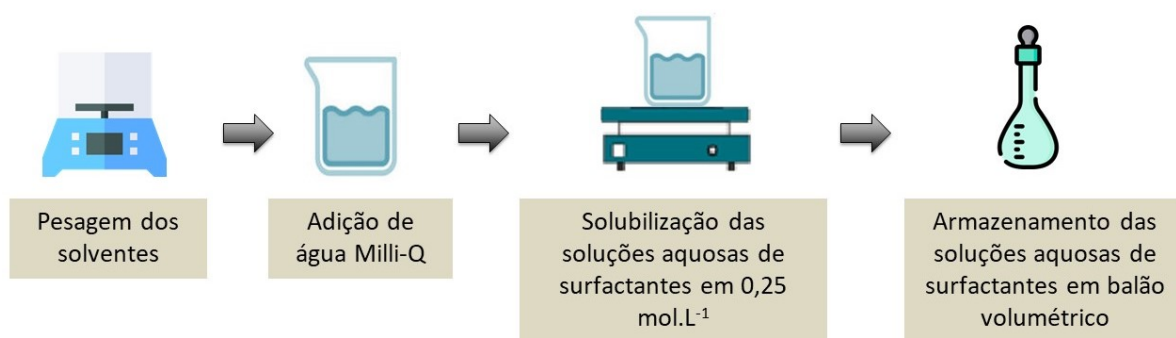
Nome	Abreviação	Estrutura química	Massa molecular (g/mol)
Surfactantes catiônicos			
Brometo de hexadeciltrimetilamônio	CTAB		364,45
Cloreto de tributil-1-tetradecilfosfônio	[P _{4,4,4,14}]Cl		435,15
Surfactante aniônico			
Sódio sulfato de dodecil	SDS		288,38
Surfactante não-iônico			

Nome	Abreviação	Estrutura química	Massa molecular (g/mol)
Polioxiletileno p-t-octil fenol	Triton X-114		537
Solução controle			
Cloreto de sódio	NaCl	$\text{Na}^+ \quad \text{Cl}^-$	58,44
Sais de fosfato			
Fosfato de potássio monobásico anidro	KH_2PO_4		136,08
Fosfato de potássio dibásico anidro	K_2HPO_4		174,17

4.2. Preparo das soluções

Para o rompimento celular, inicialmente, foram propostos parâmetros iniciais de teste com base na metodologia para extração da proteína GFP, utilizada por Martins et al., 2018. Os parâmetros de razão sólido-líquido para biomassa úmida-solução aquosa de surfactante extrator, temperatura, tempo de agitação e concentração de surfactante são: razão 1:9 (m/v), temperatura ambiente a 25°C, 1 hora de agitação e concentração de surfactante a 0,25 mol.L⁻¹. Em etapa posterior, tais parâmetros deverão ser otimizados a fim de encontrar a extração ideal. Logo, todos solventes utilizados no estudo foram preparados conforme esquema abaixo:

Figura 3. Preparo das soluções aquosas Fonte: autora.



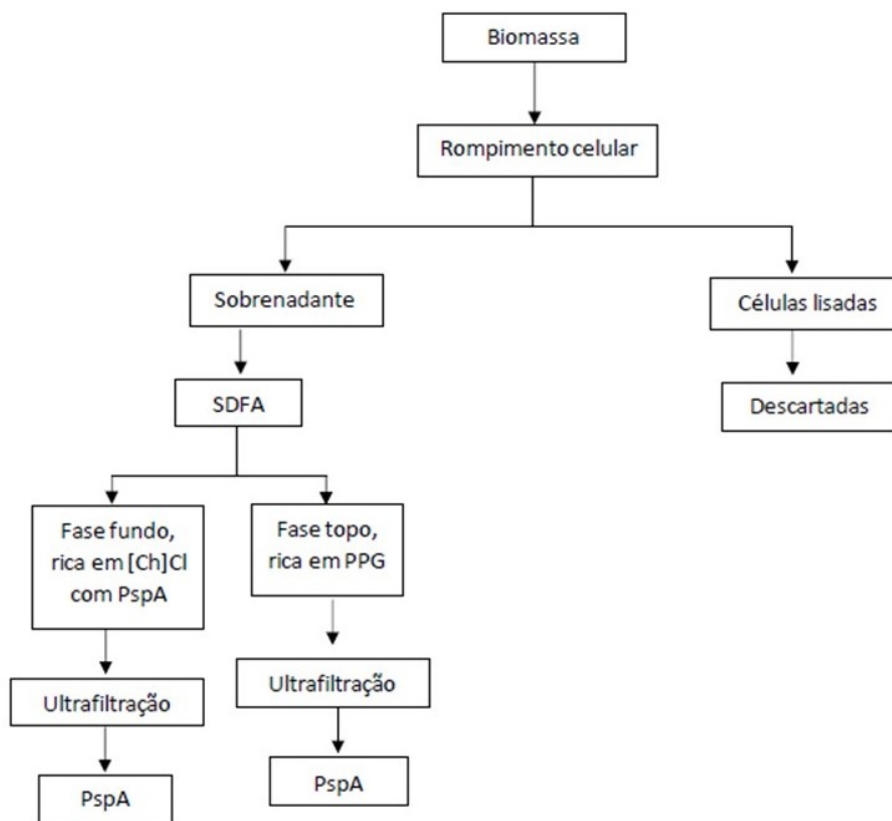
4.3. Metodologia de rompimento celular

A amostra foi pesada em tubos de fundo cônico para centrífuga de capacidade 15 mL na proporção biomassa:solvente de 1:9 (m/m). Para o método mecânico foi empregada a metodologia de Martins et al., 2018 modificada. Esse método foi empregado como controle. A amostra contendo o tampão fosfato 0,25 mol.L⁻¹ (pH 7.2), foi homogeneizada em ultrassom a 20 kHz, em banho de gelo a 4°C a fim de evitar temperatura superior a 40°C e dificultar, assim, desnaturação proteica. Foram realizados 10 ciclos de 1 min ligado/1 min desligado, totalizando 10 minutos.

Nos métodos químicos de rompimento celular foram utilizadas soluções dos surfactantes [P_{4,4,4,14}]Cl, CTAB, SDS e Triton X-114. Para controle negativo, utilizou-se da solução de NaCl que promove rompimento celular por alta pressão osmótica à temperatura ambiente (25°C), homogeneizadas em agitador orbital a 50 RPM, durante 1 h (fluxograma

abaixo – Figura 4). Posteriormente, as amostras foram clarificadas a 5000 xg, por 20 min e o sobrenadante armazenado a -20°C para posteriores análises e caracterização proteica.

Figura 4. Fluxograma com as etapas de rompimento celular.



4.4. Validação da metodologia de determinação de proteínas

Utilizando como padrão a albumina de soro bovina (BSA), foi feita uma curva analítica nos comprimentos de onda de interesse para o estudo: 280 nm para o método de leitura direta UV-VIS e 595 nm para o método colorimétrico de Bradford (BRADFORD, 1976). A seguir, a composição da curva de calibração (Tabela 3):

Tabela 3. Composição da curva de calibração para determinação de proteínas totais

Volume padrão (mL)	Volume água Milli-Q (mL)	[BSA] mg/mL
0,000	2,000	0,000
0,250	1,750	0,125
0,500	1,500	0,250
0,750	1,250	0,375
1,000	1,000	0,500

1,250	0,750	0,625
1,500	0,500	0,750
1,750	0,250	0,875
2,000	0	1,000

A determinação de proteínas totais pelo método de leitura UV-Vis foi realizada em espectrofotômetro a 280 nm com a adição da solução em cubeta de quartzo (capacidade 1,0 mL) e em leitor de placas com microplacas tratadas modelo Corning® UV, #REF3635.

Já pelo método colorimétrico de Bradford, a reação foi feita em tubos de ensaio em vidro pela adição de 1,5 mL do reagente de Bradford Sigma™, pronto para uso; e 50 uL de solução de BSA. A solução homogeneizada em vórtex é deixada em abrigo da luz por 10 minutos seguido pela transferência para cubetas acrílicas analisadas a 595nm em espectrofotômetro UV-Vis e também em microplacas, modelo Corning® UV, #REF3635.

O emprego do método colorimétrico envolve a adição de uma solução ácida do corante Coomassie® Brilliant Blue G-250 na solução de proteína. O corante se liga primariamente aos resíduos de aminoácidos básicos e aromáticos, através de interações hidrofóbicas e eletrostáticas. Ocorre, então, a formação de um complexo de coloração azul, alterando a cor da solução que é medida através da absorbância em 595 nm (MORAES, 2004). As absorbâncias foram obtidas em triplicata, medidas em espectrofotômetro UV/VIS, Hitachi modelo U-2900, e leitor de placas, EnSpire® *multimode plate reader*, e assim, foi calculada a curva de calibração. Com as quantificações realizadas, foram obtidos os gráficos representados nos Anexos 1 e 2, para método leitura direta em 280nm, e método colorimétrico em 595nm, respectivamente.

Com essa relação (equação da reta) obtida, é possível estimar a concentração de proteínas de uma amostra desconhecida, como é o caso da determinação da PspA4Pro. Foi observado que as absorbâncias obtidas leitor de placas tiveram resultados mais precisos, principalmente a leitura a 280nm, uma vez que o reagente de Bradford poderia interagir com os surfactantes presentes na amostra e apontar valores equivocados de absorbância. Para quantificação da PspA, então, foi utilizada a equação abaixo:

$$Cp = \left(\frac{(Abs_{280}).X - 0,0099}{0,3181} \right) \quad \text{Equação I}$$

Em que:

C_p = concentração de proteínas (mg/mL);

Abs280 = absorvância medida no comprimento de onda de 280 nm.

A equação obtida pelo método colorimétrico de Bradford foi utilizada para quantificação das proteínas na etapa de purificação, após a remoção dos surfactantes e por consequência sua possibilidade de interação com o reagente do método.

$$C_p = \left(\frac{(Abs_{595}) \cdot X + 0,0147}{0,4403} \right) \quad \text{Equação II}$$

Em que:

C_p = concentração de proteínas (mg/mL);

Abs595 = absorvância medida no comprimento de onda de 595 nm.

A equação obtida pelo método de leitura direta UV-Vis foi utilizada para quantificar as proteínas logo após o rompimento celular e extração das proteínas pelos agentes empregados, agentes estes utilizados para comparar a possível presença de interações entre os surfactantes e os mesmos.

4.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante SDS-PAGE

Com as leituras realizadas, foi possível obter a curva de calibração para quantificação de proteínas totais. A quantificação de proteínas totais é importante para atender o limite de resolução do gel disponível. Segundo Silva Jr. (2001), gel com dimensões a ordem de 100x100x1mm, como os deste trabalho, conseguem resolver a carga máxima de 5,0 ug de proteínas por unidade de poço polimerizado. A seguir a composição dos géis aplicados no sistema descontinuo:

Tabela 4. Composição do gel de eletroforese SDS-PAGE.

Composição dos géis	Volumes	
	Fracionador (12%)	Concentrador (5%)
Acrilamida + bisacrilamida (T = 30%, C = 3%)	8,4 mL	1,5 mL
Tris-HCl 1,50 mol.L ⁻¹ pH = 8,80	4,9 mL	0
Tris-HCl 1,00 mol.L ⁻¹ pH = 6,8	0	1,6 mL

SDS 10% (m/v)	2 mL	1,3 mL
N,N,N',N'-trametiletilenodiamino (TEMED) P.A./A.C.S.	30 µL	15 µL
Persulfato de amônio 10% (m/v)	110 µL	65 µL
Água ultrapura tipo Milli-Q®	4,5 mL	8,2 mL
TOTAL	V = 20 mL	V = 12 mL

Foi padronizada uma concentração de 1.0 mg/mL de proteínas a para realizar a eletroforese, e para isso, a amostra foi dissociada para desestruturar a forma quaternária das proteínas, rompendo as ligações dissulfeto e de hidrogênio entre os aminoácidos residuais, e nesta etapa foi utilizado o tampão dissociante a base de β -mercaptoetanol. Após incubação da amostra em banho fervente, foi feita a polimerização dos géis na combinação dos monômeros acrilamida e bisacrilamida, que determinam a porosidade do meio. O gel inferior possui de 10% a 15% da cotada combinação, sendo também chamado de gel fracionador; e o gel inferior, possui de 3% a 5% da combinação, sendo chamado de gel concentrador. Após, a corrida eletroforética ocorreu em 80V, corrente fixa de 20 mA por 2h + 100V por 1h. A revelação dos géis foi feita por corante Coomassie Brilliant Blue, escaneados pelo BioRad® *Molecular Imager GelDoc™ XR + Image Lab Software*.

4.6. Sistema Duas Fases Aquosas (SDFA)

Os sistemas de duas fases aquosas (SDFA) consistem em duas fases imiscíveis, ricas em água, formadas pela mistura de polímeros, sais e/ou líquidos iônicos em meio aquoso. Foram, então, definidas as seguintes proporções (m/m) para microtubo graduado de centrífuga com capacidade de 2,0 mL: 45% PPG-400; 12% [Ch]Cl; 10% amostra contendo PspA4Pro e q.s.p 2,0g água Milli-Q. Após centrifugação, as fases topo e fundo se evidenciaram e foi feita nova eletroforese SDS-PAGE.

4.7. Ultrafiltração

Com o concentrador Vivaspin 20 MWCO 10.000, foi realizada repetidamente (2 vezes) a ultrafiltração da solução pós extração da PspA4Pro com os surfactantes, a fim de realizar novo SDFA e compará-lo com os resultados obtidos. Foram adicionados 5 mL de solução no concentrador e 1 mL de água Milli-Q, centrifugado em 5000 RPM, 25°C e 30 minutos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante – SDS-PAGE

Sua ação consiste em um campo elétrico, no qual as partículas carregadas estão dispersas em solução eletrolítica migram em direção ao eletrodo de polaridade oposta, através da diferença de potencial. A eletroforese é empregada no fracionamento e caracterização qualitativa de proteínas, peptídeos ou aminoácidos que possam apresentar cargas - seja por ionização, dissociação ou associação de outras substâncias carregadas -, em função do pH do meio. A separação eletroforética depende da relação entre carga e peso molecular, uma vez que alteram a velocidade de migração, gerando as separações bem definidas.

A porosidade do gel se dá pelas propriedades de tamis molecular, ou seja, a resistência que opõe à migração das macromoléculas. As condições desnaturantes em gel de poliacrilamida favorecem a dissociação de proteínas nas subunidades polipeptídicas, ou seja, a migração eletroforética dos complexos detergentes polipeptídios ocorre em relação ao ânodo, sendo possível determinar a massa molecular de uma proteína a partir de sua mobilidade relativa, comparando com solução padrão, massa molecular e banda conhecidas (VITOLLO et al., 2015).

A Figura 5 abaixo demonstra a execução da eletroforese SDS-PAGE.

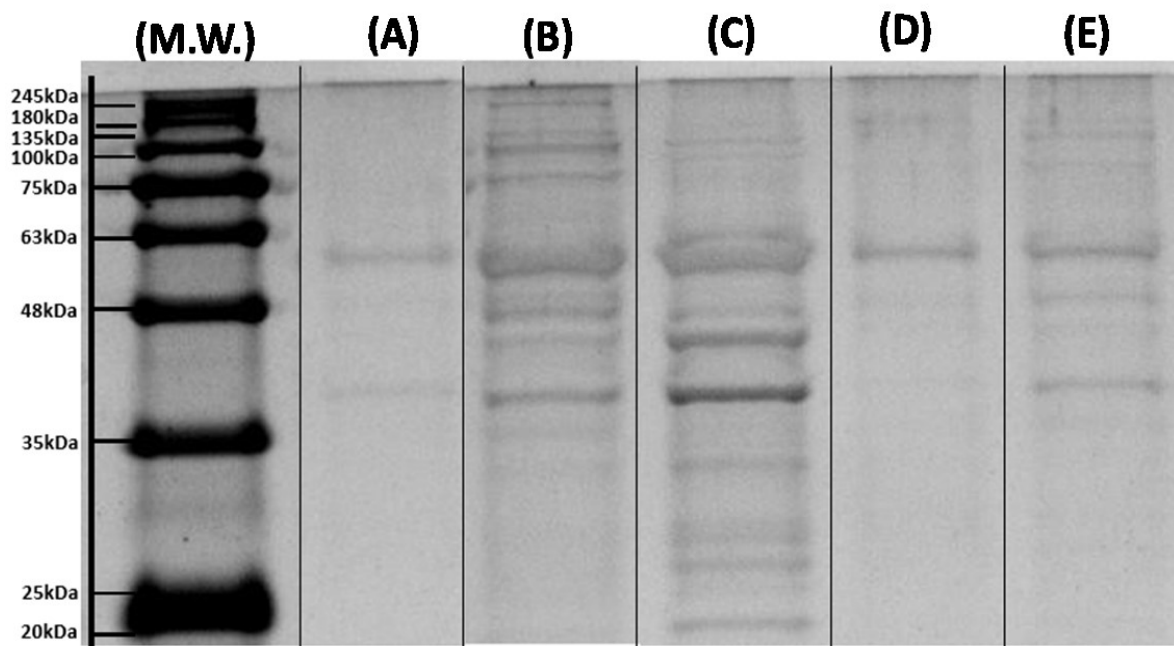
Figura 5. Equipamentos para execução da eletroforese SDS-PAGE.



5.2. Rompimento celular

De acordo com Figueiredo (2014) será adotado o tamanho da PspA4Pro como aproximadamente 60 kDa para os próximos experimentos. Na etapa de rompimento celular, foram feitas aplicações de amostras a 1,0 mg/mL (por absorbância a 280 nm) em poço de 10 uL no gel. A comparação de extração proteica por meio da indução da permeabilidade celular foi feita com o padrão de peso molecular proteico BLUEye da Sigma™ *versus* os clarificados obtidos após A) extração com o solvente [P_{4,4,4,14}]Cl; B) extração com ultrassom; C) extração de NaCl com alta pressão osmótica; D) extração com solvente CTAB; E extração com solvente SDS.

Figura 6. Gel de eletroforese SDS-PAGE com: M.W.) Padrão de peso molecular proteico BLUeye da Sigma™; A) extrato de proteína bruta após extração com solvente (obtida após clarificação por $[P_{4,4,4,14}]Cl$); B) extrato de proteína bruta após extração com ultrassom;



Ambas metodologias de extração (mecânica ou química) demonstraram serem capaz de romper a membrana celular da *E.coli* e liberar a proteína de interesse PspA4Pro. Ainda, os compostos surfactantes iônicos demonstraram capacidade não apenas de extrair a PspA4Pro, mas também diminuir a quantidade de contaminantes em relação às outras proteínas intracelulares, conforme eletroforese. As amostras obtidas na figura 6 que aparentam ter menos contaminantes foram atingidas pela extração com os surfactantes CTAB e $[P_{4,4,4,14}]Cl$. Os géis foram revelados pelo corante Coomassie Brilliant Blue e escaneados pelo GelDoc® XR + BioRad.

Para identificação das proteínas de interesse, é feita a análise de perfil de bandas por densitograma, com a abundância relativa (%) de cada componente da amostra. Cada pico representa um tamanho do extrato proteico em kDa, e a altura de cada pico demonstra a abundância relativa extrato proteico. De acordo com o tamanho estimado da PspA, foram obtidos os valores de 32,4% de proteína PspA do método mecânico de ultrassom, com um aumento para 68,4% com $[P_{4,4,4,14}]Cl$ e 89,9% com CTAB. A análise permite observar que o método de extração com surfactantes iônicos consegue alcançar uma maior abundância relativa da proteína alvo, conforme figuras 7 e 8, com aplicações de amostras a 1,0 mg/mL (por 280 nm) em poço de 10 uL.

Figura 7. Densitograma com perfil de bandas e análise da abundância relativa da banda (%) do gel de eletroforese SDS-PAGE de: **M.W.)** Padrão de peso molecular proteico BLUeye da Sigma™; **A)** extrato de proteína bruta após extração com solvente (obtido após clarificação por $[P_{4,4,4,14}]Cl$); **B)** extrato de proteína bruta de extração assistida por ultrassom.

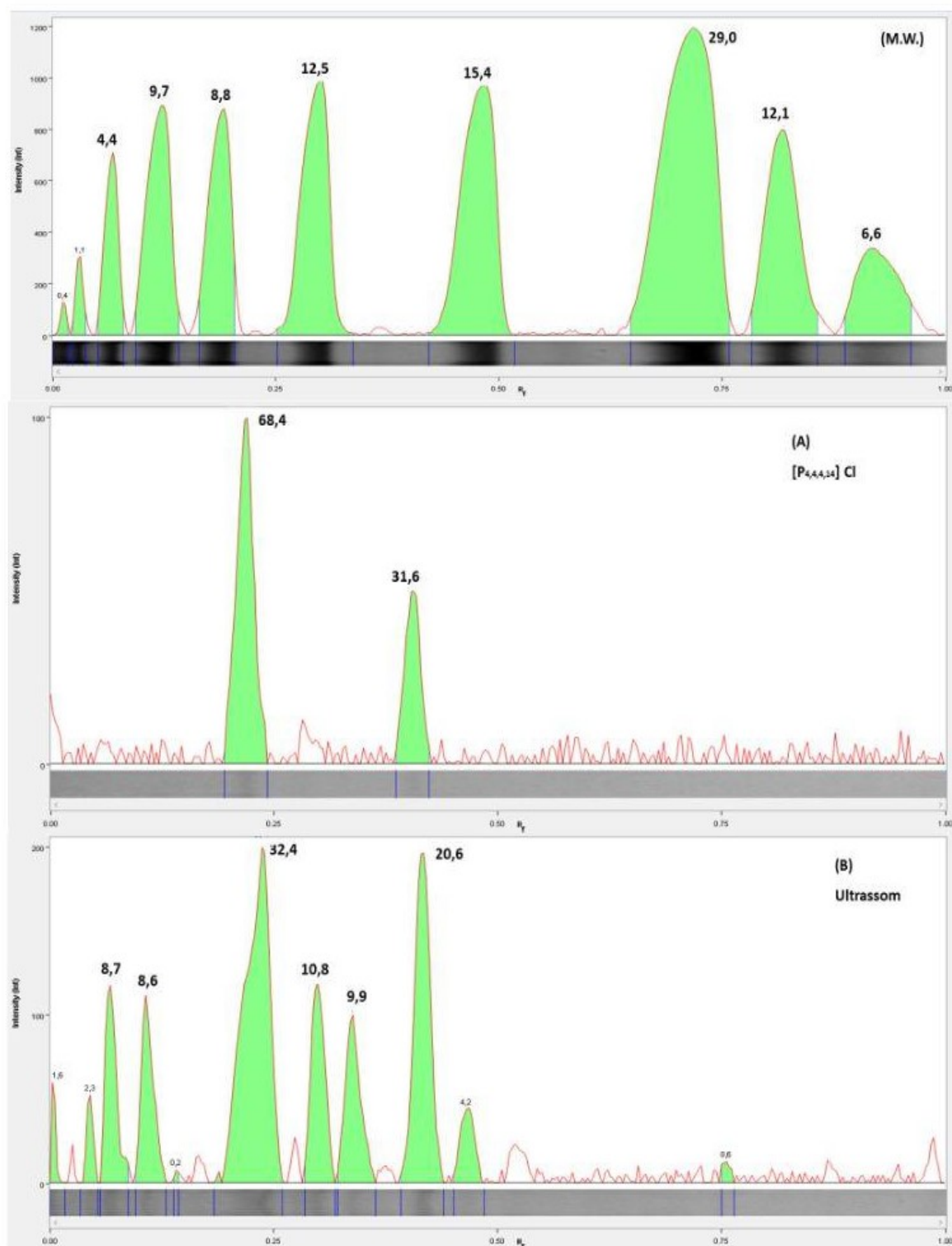
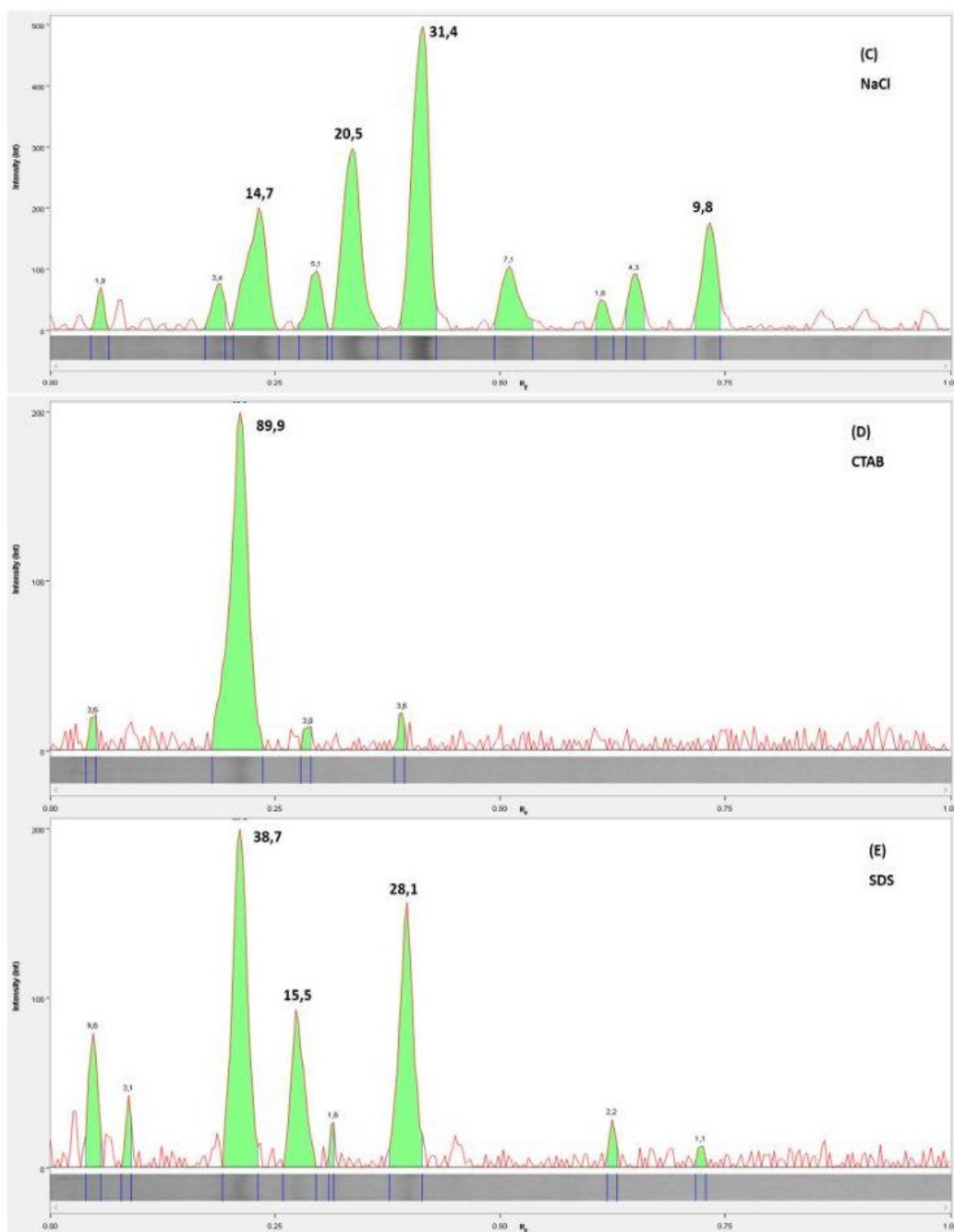


Figura 8. Densitograma com perfil de bandas e análise da abundância relativa da banda (%) do gel de eletroforese SDS-PAGE de: **C)** extrato de proteína bruta após extração de NaCl com alta pressão osmótica; **D)** extrato de proteína bruta após extração com solvente (obtido após clarificação por CTAB); **E)** extrato de proteína

bruta após extração com solvente (obtido após clarificação por SDS).



A extração da PspA4Pro foi capaz de também minimizar os seus contaminantes porque, de acordo com Jing et al., 2016, os surfactantes iônicos, em especial com cadeias alquílicas com mais de 10 carbonos, quando interagem com as membranas celulares e suas proteínas, promovem alterações celulares que causam expansão e/ou permeabilização dessas

membranas, o que permite à liberação de seu material intracelular e ruptura celular. O desempenho da extração química se mostra ser mais eficiente do que a extração por ultrassom, que não distingue as proteínas intracelulares (JING et al., 2016).

Através da análise da eletroforese desnaturante SDS-PAGE e de seu perfil de bandas com sua abundância relativa, a concentração de $0,25 \text{ mol.L}^{-1}$ de agente tensoativo foi capaz liberar seletivamente a PspA da membrana. Um estudo feito com agentes surfactantes para liberação intracelular da proteína verde fluorescente (GFP) concluiu que ao utilizar concentrações de surfactantes igual ou menor que a sua respectiva concentração micelar crítica (CMC) dificulta a liberação do conteúdo intracelular, sendo favorecida para concentrações superiores aos seus valores de CMC. (MARTINS et al., 2018). A diminuição da concentração de tensoativo utilizado na extração é uma interessante perspectiva futura, pois poderá diminuir os custos de produção da futura vacina objetivo deste trabalho.

À título de informação, a tabela 5 contém os valores de CMC dos surfactantes utilizados no trabalho (SINGH et al., 2015):

Tabela 5. Informações sobre os valores de concentração micelar crítica dos surfactantes.

Surfactante	Concentração micelar crítica (CMC)
$[P_{4,4,4,14}]Cl$	4.7 mM
CTAB	0.9 mM
SDS	8.0 mM
Triton X-114	0.2 mM

É importante destacar que nem todos os surfactantes induziram da mesma maneira tais alterações na permeabilidade celular, expressa pela menor abundância relativa da PspA no sobrenadante do lisado com o surfactante aniônico, o SDS, provavelmente por esse tensoativo possuir interações eletrostáticas repulsivas com os fosfolipídios negativamente carregados da membrana (LIM et al., 2014).

5.3. Sistema de duas fases aquosas (SDFA)

Como etapa posterior, foi utilizado o sistema de duas fases aquosas (SDFA) para extrair a PspA4Pro do extrato bruto, no qual a proteína PspA4Pro ficou totalmente retida na fase de fundo do sistema PPG-400/[Ch]Cl, conforme ilustrado no Anexo 3, sendo esta a fase rica em [Ch]Cl e mais hidrofílica, considerando o teor de água (% em peso) das fases.

Um trabalho feito com a proteína verde fluorescente (GFP) objetivando sua recuperação partir de *E. coli* demonstrou que os sistemas compostos por PPG-400 e [Ch]Cl possuem um excelente desempenho de extração, no qual a GFP foi completamente extraída para a fase rica em [Ch]Cl (SANTOS et al., 2018), o que está de acordo com os resultados obtidos com a PspA.

Entende-se que as interações hidrofóbicas-hidrofílicas exerceram importante papel para que a proteína particionasse para a fase com maior teor de água, demonstrando certo caráter hidrofílico da PspA4Pro, pois, segundo Salabat et al. (2019), as proteínas hidrofílicas costumam ter extração seletiva para a fase rica em sal.

A aplicação do SDFA para a GFP demonstrou grande capacidade de purificá-la de proteínas contaminantes em etapa única, com rendimentos de pureza próximos a 100%. Tal comportamento aparenta semelhança com a PspA uma vez que ambas são hidrofílicas, pois, ao comparar com o extrato bruto, há menos bandas na fase de fundo, demonstrando que o sistema foi capaz de remover contaminantes, que devem ser parecidos que migram para a fase polimérica.

5.4. Ultrafiltração

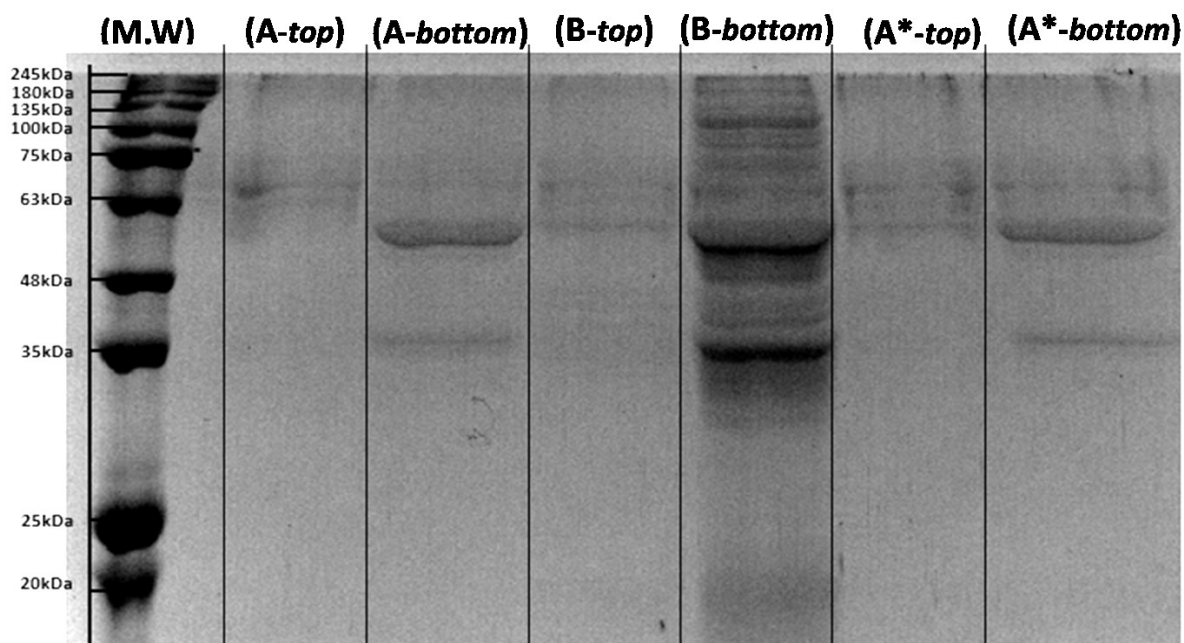
A etapa de ultrafiltração atua como um método que remove pirogênicos - substância que aumenta a temperatura do ser humano ou animal (reação de febre) ao ativar o sistema imune inato. Tal descontaminação gera uma purificação quando, previamente, houve desagregação das moléculas agregadas, e neste caso, houve a separação na extração (PINTO et al., 2010).

Após extração da proteína de interesse com soluções aquosas de surfactantes, foi formado o sistema SDFA, com homogeneização e centrifugação. Para análise, foi feita uma etapa a mais de ultrafiltração com o concentrador Vivaspin 6 MWCO 10.000, 2x para purificar a PspA, e posteriormente formado um novo sistema SDFA, para avaliar dois

diferentes cenários: 1) amostra contendo PspA pós extração; e 2) amostra contendo PspA pós extração e ultrafiltração.

Ambos os cenários foram analisados por eletroforese SDS-PAGE com aplicação de amostra a 1,0 mg/mL (por 280 nm) em poço de 10 uL. Na figura 09, é possível comparar a extração de método mecânico, por ultrassom, com a extração de método químico, por $[P_{4,4,4,14}]Cl$ após ultrafiltração em única etapa e em duas etapas seguidas.

Figura 9. Gel de eletroforese SDS-PAGE com: **M.W.)** Padrão de peso molecular proteico BLUeye da Sigma™; **A-top)** extrato de proteína da fase rica em PPG-400 (topo) do sistema SDFA PPG-400/[Ch]Cl (obtido após clarificação por ultrafiltração a 10.000 kDa para remover $[P_{4,4,4,14}]Cl$); **A-bottom)** extrato de proteína da fase rica em [Ch]Cl (parte inferior) do SDFA PPG-400/[Ch]Cl (obtido após clarificação por ultrafiltração a 10.000 kDa para remover $[P_{4,4,4,14}]Cl$); **B-top)** extrato de proteína da fase rica em PPG-400 (topo) do SDFA PPG-400/[Ch]Cl (obtido da extração assistida por ultrassom); **B-bottom)** extrato de proteína presente da fase rica em [Ch]Cl (inferior) do SDFA PPG-400/[Ch]Cl (obtido da extração assistida por ultrassom); **A*-top)** extrato de proteína concentrado da fase rica em PPG-400 (topo) do SDFA PPG-400/[Ch]Cl ABS (obtida após 2x ultrafiltração a 10.000 kDa para remover $[P_{4,4,4,14}]Cl$); **A*-bottom)** extrato de proteína concentrado da fase rica em [Ch]Cl (fundo) do SDFA PPG-400/[Ch]Cl (obtido após 2x ultrafiltração a 10.000 kDa para remover $[P_{4,4,4,14}]Cl$).

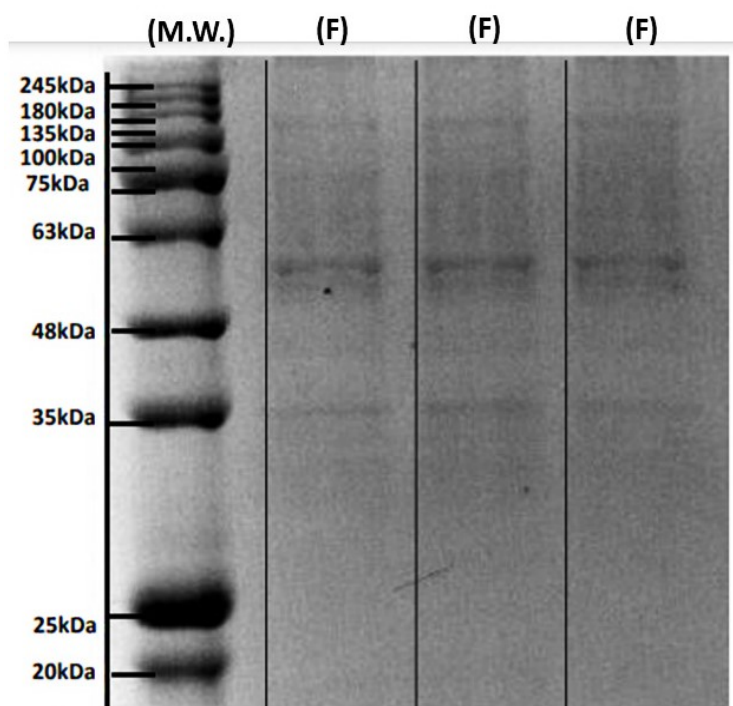


Estudos com a GFP demonstraram que a ultrafiltração realizada após o SDFA, na fase rica em [Ch]Cl contendo a proteína de interesse, foi capaz de remover impurezas residuais de baixo peso molecular, resultando em um produto altamente purificado (SANTOS et al., 2018). Dessa forma, as bandas A* na Figura 10 demonstram que se confirmou a remoção de contaminantes da PspA4Pro com SDFA composto por PPG-400 e [Ch]Cl. É possível notar que há uma mínima diferença na purificação da PspA4Pro utilizando somente o sistema SDFA em comparação com o sistema SDFA + ultrafiltração, demonstrando que somente o

sistema seria capaz de purificar a proteína, não necessitando do processo adicional da ultrafiltração e, por consequência, diminuindo o custo final do processo, resultado que concorda com os obtidos para a GFP.

Após os resultados obtidos com os surfactantes iônicos, foi decidido realizar o mesmo teste de extração por método químico da PspA com um novo agente de extração química, o Triton X-114, um surfactante não iônico, com o objetivo de avaliar a interação do tensoativo com a membrana celular com a ausência de cargas iônicas do solvente. Conforme Figura 11 abaixo, os resultados foram positivos, demonstrando que tensoativos não-iônicos também são capazes de permeabilizar a membrana celular e liberar a PspA.

Figura 10. Gel de electroforese SDS-PAGE com: **M.W.)** Padrão de peso molecular proteico BLUeye da Sigma™; **F)** extrato de proteína bruta após extração com solvente (obtida após clarificação por Triton X-114. Aplicações de amostras a 1,0 mg/mL (por 280 nm) em poço de 10 uL.



A fim de ampliar os parâmetros do estudo, foi decidido variar o tempo de extração para os melhores solventes até então, CTAB e $[P_{4,4,4,14}]Cl$, juntamente com o Triton X-114. Foram testados 45, 30 e 15 minutos, respectivamente. Foram feitas aplicações de amostras a 1,0 mg/mL (por 280 nm) em poço de 10 uL. Os resultados demonstraram, conforme figuras 12, 13 e 14 abaixo, que o tempo de extração pode diminuir sem prejuízos ao processo de recuperação da PspA4Pro.

Figura 11. Gel de electroforese SDS-PAGE com: **M.W.)** Padrão de peso molecular proteico BLUeye da Sigma™; **D-45')** extrato de proteína bruta após extração de 45 min com solvente (obtida após clarificação por CTAB); **D-30')** extrato de proteína bruta após extração de 30 min com solvente (obtida após clarificação por CTAB); e **D-15')** extrato de proteína bruta após extração de 15 min com solvente (obtida após clarificação por CTAB).

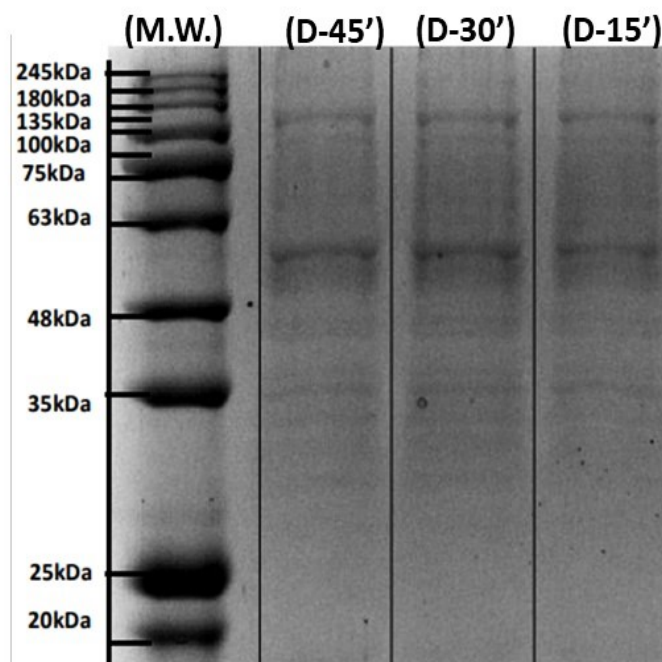


Figura 12. Gel de electroforese SDS-PAGE com: **M.W.)** Padrão de peso molecular proteico BLUeye da Sigma™; **D-45')** extrato de proteína bruta após extração de 45 min com solvente (obtida após clarificação por Triton X-114); **D-30')** extrato de proteína bruta após extração de 30 min com solvente (obtida após clarificação por Triton X-114); e **D-15')** extrato de proteína bruta após extração de 15 min com solvente (obtida após clarificação por Triton X-114).

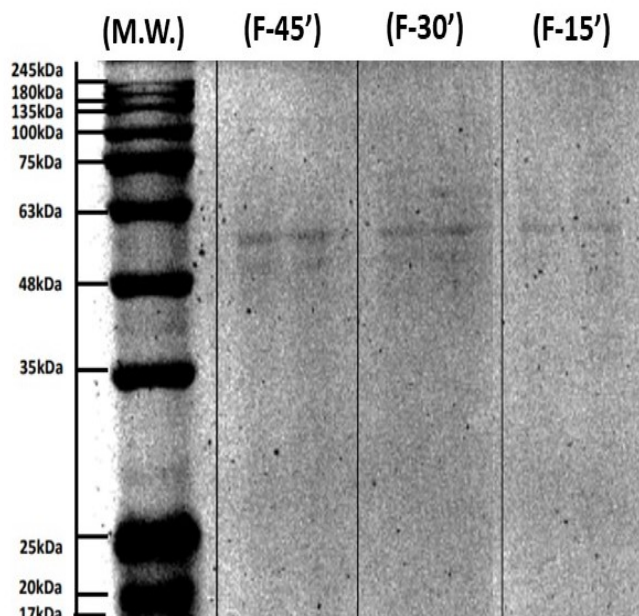
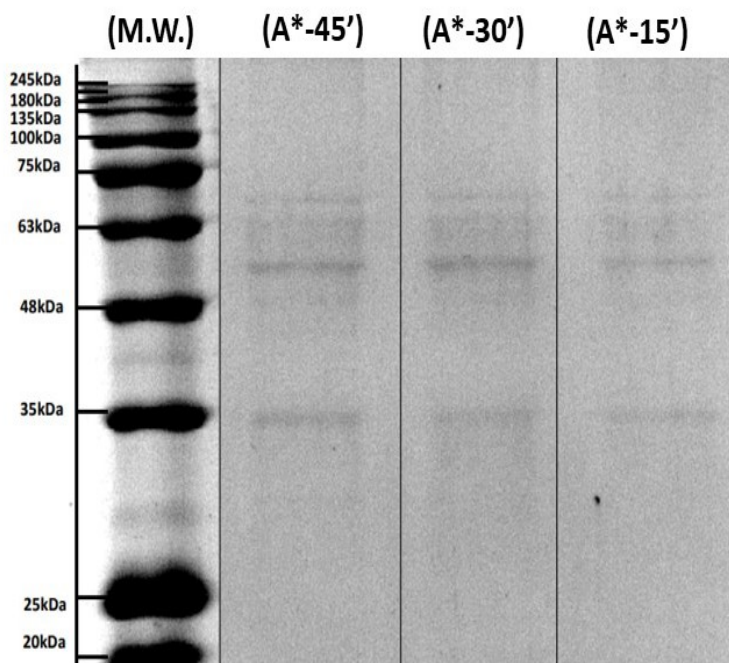


Figura 13. Gel de electroforese SDS-PAGE com: **M.W.)** Padrão de peso molecular proteico BLUeye da Sigma™; **D-45')** extrato de proteína bruta após extração de 45 min com solvente (obtida após clarificação por $[P_{4,4,4,14}]Cl$ e posterior 2x ultrafiltração a 10.000 kDa para remover $[P_{4,4,4,14}]Cl$); **D-30')** extrato de proteína bruta após extração de 30 min com solvente (obtida após clarificação por $[P_{4,4,4,14}]Cl$ e posterior 2x ultrafiltração a 10.000 kDa para remover $[P_{4,4,4,14}]Cl$); e **D-15')** extrato de proteína bruta após extração de 15 min com solvente (obtida após clarificação por $[P_{4,4,4,14}]Cl$ e posterior 2x ultrafiltração a 10.000 kDa para remover $[P_{4,4,4,14}]Cl$).



Considerando que a extração com 15 minutos aparenta uma banda de menor coloração, somente os tempos de 45 e 30 minutos, respectivamente, foram considerados para a otimização do processo. Foi padronizado que o melhor tempo para o surfactante

permeabilizar a membrana celular e conseguir a liberação da PspA é de 30 minutos, diminuindo pela metade em relação à primeira padronização feita no estudo, reforçando a efetividade do método de extração com surfactantes.

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho avaliou-se diferentes metodologias para extrair PspA4Pro de *E. coli* BL21 recombinante, utilizando o método convencional de extração por ultrassom como uma comparação à nova proposta de metodologia, com soluções aquosas de surfactantes, a fim de induzir a permeabilização celular e liberação da PspA intracelular.

Dos compostos tensoativos estudados, as estruturas catiônicas induziram maior extração da PspA das células. Os melhores agentes tensoativos encontrados foram $[P_{4,4,4,14}]Cl$ e o CTAB, capazes de liberar a proteína de interesse com soluções aquosas de $0,25 \text{ mol.L}^{-1}$ em 30 minutos, mostrando-se mais eficaz para a extração do que o método assistido por ultrassom. O Triton X-114 também demonstrou eficiência na liberação da proteína PspA, necessitando ser testado no sistema SDFA e ultrafiltração futuramente.

O tratamento das células de *E. coli* com agentes tensoativos se mostrou vantajoso também pelo potencial em superar as limitações da tecnologia *upscaling* de ultrassom, mostrando ser uma metodologia promissora, simples e eficaz para aplicação industrial, por ser facilmente integrada com outras etapas de processamento, como SDFA composto por PPG-400 e $[Ch]Cl$, abordagem alternativa eficaz e economicamente viável.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

É importante considerar como próximos passos de oportunidade da pesquisa a maior otimização dos parâmetros, como manter o tempo de extração em 30 min, variando a molaridade (0,125, 0,250 e $0,500 \text{ mol.L}^{-1}$) e a proporção de sólido/líquido (1:4; 1:9; 1:19) m/m, a fim de obter as melhores condições para extração e purificação da PspA utilizando surfactantes iônicos e não-iônicos.

Como desafios futuros para a vacina objeto de estudo deste trabalho, há os seguintes aspectos legais de pesquisa clínica, seguindo princípios de controle de qualidade e ética: a) continuidade dos estudos pré-clínicos, demonstrando atividade imunogênica e segurança,

considerando a estabilidade tecnológica da formulação; e b) estudos clínicos, sendo Fase I, demonstração da segurança com avaliação inicial em humanos; Fase II (estudo terapêutico piloto), avaliação da eficácia da imunogenicidade e investigação de efeitos colaterais; Fase III, confirmação da eficácia, segurança e monitoramento das reações adversas, somente após os estudos nesta etapa é possível obter o registro sanitário; e Fase IV, pesquisas de vigilância pós-comercialização (QUENTAL, 2006).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDRE, Rodrigo; FERREIRA, Cristina; SQUIASSI, Aline; SANTANA, Carlos; ALMEIDA, Rodrigo; MICHELIM, Lessandra. Avaliação de custo-efetividade da vacina pneumocócica conjugada 13-valente comparada à vacina pneumocócica polissacarídica e não vacinação no Sistema de Saúde Suplementar Brasileiro. **Jornal Brasileiro de Economia da Saúde**, v. 8, n. 3, p. 192-196, dez. 2016.

ALONSODEVELASCO, E; VERHEUL, A F; VERHOEF, J; SNIPPE, H. Streptococcus pneumoniae: virulence factors, pathogenesis, and vaccines. **Microbiological Reviews**, v. 59, n. 4, p. 591-603, dez. 1995.

BAESHEN, Mohammed N.; AL-HEJIN, Ahmed M.; BORA, Roop S.; AHMED, Mohamed M. M.; RAMADAN, Hassan A. I.; SAINI, Kulvinder S.; BAESHEN, Nabih A.; REDWAN, Elrashdy M.. Production of Biopharmaceuticals in E. coli: current scenario and future perspectives. **Journal Of Microbiology And Biotechnology**, v. 25, n. 7, p. 953-962, 28 jul. 2015.

BRADFORD, Marion M.. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, maio 1976. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 17, de 16 de abril de 2010, dispõe sobre Boas Práticas de fabricação de Medicamentos. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 315, de 26 de outubro de 2005, dispõe sobre o Regulamento Técnico de Registro, Alterações Pós-Registro e Revalidação de Registro dos Produtos Biológicos Terminados. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 134, de 13 de junho de 2001, determina a todos

os estabelecimentos fabricantes de medicamentos, os cumprimentos das diretrizes estabelecidas no Regulamento Técnico das Boas Práticas para a Fabricação de Medicamento. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 80, de 18 de março de 2002, dispõe sobre a regulamentação dos procedimentos de registro e pós- registro de produtos biológicos. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 55, de 16 de dezembro de 2010, dispõe sobre o registro de produtos biológicos novos e produtos biológicos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Lei nº 6.360 de 23 de dezembro de 1976, dispõe sobre a vigilância sanitária a que ficam sujeitos os medicamentos, as drogas, os insumos farmacêuticos e correlatos, cosméticos, saneantes e outros produtos, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 1976.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 16 de 06 de março de 1995, dispõe sobre a a necessidade de instituir e implementar a fiscalização e a inspeção nas indústrias farmacêuticas, para avaliar a qualidade do processo de produção, com base nos instrumentos harmonizados no Mercosul. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 1995.

CHAN, H S; A DILL, K. Polymer Principles in Protein Structure and Stability. **Annual Review Of Biophysics And Biophysical Chemistry**, v. 20, n. 1, p. 447-490, jun. 1991.

CONSTENLA, DO. **Economic impact of pneumococcal conjugate vaccination in Brazil, Chile and Uruguay**. Ver Panam Salud Publica;24:101-12, 2008.

DALTIN, Decio. **Tensoativos: química, propriedades e aplicações**. São Paulo: Editora Edgard Blucher, 2011.

DAS, Alope. Impact of Continuous Processing Techniques on Biologics Supply Chains. **Continuous Processing In Pharmaceutical Manufacturing**, p. 53-70, 5 dez. 2014.

DEMAGALHAES, C; ARRUDA, M. Sample preparation for metalloprotein analysis: a case study using horse chestnuts. **Talanta**, v. 71, n. 5, p. 1958-1963, 30 mar. 2007.

DEBENEDICTIS, Elizabeth P.; HAMED, Elham; KETEN, Sinan. Mechanical Reinforcement of Proteins with Polymer Conjugation. **Acs Nano**, v. 10, n. 2, p. 2259-2267, 28 dez. 2015.

DELVES, Peter J.; MARTIN, Seamus J.; BURTON, Dennis R.; ROITT, Ivan M.. **Fundamentos de Imunologia**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

DEMAIN, Arnold L.; VAISHNAV, Preeti. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 3, p. 297-306, maio 2009.

SANTOS, Nathalia V. dos; MARTINS, Margarida; SANTOS-EBINUMA, Valéria C.; VENTURA, Sónia P. M.; COUTINHO, João A. P.; VALENTINI, Sandro R.; PEREIRA, Jorge F. B.. Aqueous Biphasic Systems Composed of Cholinium Chloride and Polymers as Effective Platforms for the Purification of Recombinant Green Fluorescent Protein. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, [S.L.], v. 6, n. 7, p. 9383-9393, 4 jun. 2018.

ERICKSON, Brent; NELSON; WINTERS, Paul. Perspective on opportunities in industrial biotechnology in renewable chemicals. **Biotechnology Journal**, v. 7, n. 2, p. 176-185, 20 set. 2011.

FIGUEIREDO, Douglas Borges de. **Desenvolvimento do processo de purificação da proteína A de superfície de pneumococo do clado 4 (PspA4Pro)**. 2014. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

FIGUEIREDO, Douglas B.; CARVALHO, Eneas; SANTOS, Mauricio P.; KRASCHOWETZ, Stefanie; ZANARDO, Rafaela T.; CAMPANI, Gilson; SILVA, Gabriel G.; SARGO, Cíntia R.; HORTA, Antonio Carlos L.; GIORDANO, Roberto de C.. Production and purification of an untagged recombinant pneumococcal surface protein A (PspA4Pro) with high-purity and low endotoxin content. **Applied Microbiology And Biotechnology**, v. 101, n. 6, p. 2305-2317, 26 nov. 2016.

GE, Liya; WANG, Xiao-Tao; TAN, Swee Ngim; TSAI, Heng Hang; YONG, Jean W.H.; HUA, Lin. A novel method of protein extraction from yeast using ionic liquid solution. **Talanta**, [S.L.], v. 81, n. 4-5, p. 1861-1864, 15 jun. 2010.

HARRIS, E. L. V.; ANGAL, S. **"Protein purification applications: a practical approach"**. Oxford, IR Press, 179p, 1995.

HARRISON, Roger G. **"Protein purification process"**. New York, Marcel Dekker, p.381, 1994.

JING, Benxin; LAN, Nan; QIU, Jie; ZHU, Yingxi. Interaction of Ionic Liquids with a Lipid Bilayer: a biophysical study of ionic liquid cytotoxicity. **The Journal Of Physical Chemistry B**, [S.L.], v. 120, n. 10, p. 2781-2789, 8 mar. 2016.

JOHANSSON, Hans-Olof; ISHII, Marina; MINAGUTI, Mariane; FEITOSA, Eloi; PENNA, Thereza Christina Vessoni; PESSOA, Adalberto. Separation and partitioning of Green Fluorescent Protein from Escherichia coli homogenate in poly(ethylene glycol)/sodium-poly(acrylate) aqueous two-phase systems. **Separation And Purification Technology**, v. 62, n. 1, p. 166-174, ago. 2008.

KADIOGLU, Aras; WEISER, Jeffrey N.; PATON, James C.; ANDREW, Peter W.. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 4, p. 288-301, abr. 2008.

KILIKIAN, Beatriz Vahan.; PESSOA JUNIOR, Adalberto. **Purificação de produtos biotecnológicos**. Barueri, SP: Manole, 2005.

LAEMMLI, U. K.. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, ago. 1970.

LEHNINGER, T. M., NELSON, D. L. & COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 6ª Edição, Ed. Artmed, 2014.

LIM, Geraldine S.; ZIDAR, Jernej; CHEONG, Daniel W.; JAENICKE, Stephan; KLÄHN, Marco. Impact of Ionic Liquids in Aqueous Solution on Bacterial Plasma Membranes Studied with Molecular Dynamics Simulations. **The Journal Of Physical Chemistry B**, v. 118, n. 35, p. 10444-10459, 25 ago. 2014.

MARTINS, Margarida; OOI, Chien Wei; NEVES, Márcia C; PEREIRA, Jorge Fb; COUTINHO, João Ap; VENTURA, Sónia Pm. Extraction of recombinant proteins from *Escherichia coli* by cell disruption with aqueous solutions of surface-active compounds. **Journal Of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 93, n. 7, p. 1864-1870, 23 mar. 2018.

MCDANIEL, Larry S.; RALPH, Beth A.; MCDANIEL, D.Olga; BRILES, David E.. Localization of protection-eliciting epitopes on PspA of *Streptococcus pneumoniae* between amino acid residues 192 and 260. **Microbial Pathogenesis**, v. 17, n. 5, p. 323-337, nov. 1994.

MORAES, Solange Leite de; REZENDE, Maria Olímpia Oliveira. Determinação da concentração micelar crítica de ácidos húmicos por medidas de condutividade e espectroscopia. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 701-705, out. 2004.

MORENO, Adriana T.; OLIVEIRA, Maria Leonor S.; FERREIRA, Daniela M.; HO, Paulo L.; DARRIEUX, Michelle; LEITE, Luciana C. C.; FERREIRA, Jorge M. C.; PIMENTA, Fabiana C.; ANDRADE, Ana Lúcia S. S.; MIYAJI, Eliane N.. Immunization of Mice with Single PspA Fragments Induces Antibodies Capable of Mediating Complement Deposition on Different Pneumococcal Strains and Cross-Protection. **Clinical And Vaccine Immunology**, v. 17, n. 3, p. 439-446, mar. 2010.

O'BRIEN, Katherine L; WOLFSON, Lara J; WATT, James P; HENKLE, Emily; DELORIA-KNOLL, Maria; MCCALL, Natalie; LEE, Ellen; MULHOLLAND, Kim; LEVINE, Orin s; CHERIAN, Thomas. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. **The Lancet**, v. 374, n. 9693, p. 893-902, set. 2009.

OLIVEIRA, G. A. **Efeito da proteína de superfície de pneumococo A (PspA) na ação bactericida da lactoferrina sobre *S. pneumoniae* in vitro.** FESB. Bragança Paulista, SP, 2012.

Organisation for Economic **Co-operation and Development. Chemical Safety Information from Intergovernmental Organization – Choline Chloride**; UNEP Publication: Berlin, Germany, Vol. 67-48-1, 2004.

ORR, Valerie C. A.; PLECHKOVA, Natalia V.; SEDDON, Kenneth R.; REHMANN, Lars. Disruption and Wet Extraction of the Microalgae *Chlorella vulgaris* Using Room-Temperature Ionic Liquids. **Acs Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 4, n. 2, p. 591-600, 4 nov. 2015.

PERSSON, Josefine; JOHANSSON, Hans-Olof; TJERNELD, Folke. Purification of protein and recycling of polymers in a new aqueous two-phase system using two thermoseparating polymers. **Journal Of Chromatography A**, [S.L.], v. 864, n. 1, p. 31-48, dez. 1999.

PINTO, Terezinha de Jesus Andreoli e KANEKO, Telma Mary e PINTO, Antonio F. **Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos.** São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2010.

QUENTAL, Cristiane; SALLES FILHO, Sérgio. Ensaios clínicos: capacitação nacional para avaliação de medicamentos e vacinas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 9, n. 4, p. 408-424, dez. 2006.

QUENTAL, Maria V.; CABAN, Magda; PEREIRA, Matheus M.; STEPNOWSKI, Piotr; COUTINHO, João A. P.; FREIRE, Mara G.. Enhanced extraction of proteins using cholinium-based ionic liquids as phase-forming components of aqueous biphasic systems. **Biotechnology Journal**, [S.L.], v. 10, n. 9, p. 1457-1466, 30 abr. 2015.

REN, Bing; SZALAI, Alexander J.; HOLLINGSHEAD, Susan K.; BRILES, David E.. Effects of PspA and Antibodies to PspA on Activation and Deposition of Complement on the Pneumococcal Surface. **Infection And Immunity**, v. 72, n. 1, p. 114-122, jan. 2004.

SALABAT, A.; ABNOSI, M.; MOTAHARI, A. Application of aqueous mixtures of polypropylene glycol or polyethylene glycol with salts in proteomic analysis. **J. Iran. Chem. Soc**, 7 (1), 142–149, 2010.

SHAPER M, HOLLINGSHEAD SK, BENJAMIN WH JR, BRILES DE. PspA protects *Streptococcus pneumoniae* from killing by apolactoferrin, and antibody to PspA enhances killing of pneumococci by apolactoferrin. **Infect Immun**. 2004 Sep;72(9):5031-40. doi: 10.1128/IAI.72.9.5031-5040. 2004.

SINGH, VINAYIKA & TYAGI, RASHMI. Investigations of mixed surfactant systems of lauryl alcohol based bissulfosuccinate anionic gemini surfactant with conventional

surfactants: A fluorometric study. **Journal of Taibah University for Science**. 12. 10.1016/j.jtusci.2015.01.010. 2015.

SILVA JR., J. G. **Eletroforese de proteínas: Guia Teórico-prático**. Rio de Janeiro: Interciencia, 2001, 125p.

SORENSEN, H. P.; MORTENSEN, K. K. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. **Microbial Cell Factories**, v. 4, n. Figure 1, p. 1–8, 2005.

TAI SS, et al. Hemin utilization is related to virulence of *Streptococcus pneumoniae*. **Infect Immun**. 61:5401-5, 1993.

U.S. Food and Drug Administration. Select Committee on GRAS Substances (SCOGS) **Opinion: Choline Bitartrate, Choline Chloride**. <https://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/SCOGS/ucm261250.htm> (accessed August 25, 2022).

VITOLO, Michele et al. **Biotecnologia Farmacêutica: Aspectos sobre aplicação industrial**. São Paulo: Blucher., 2015.

WORD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Weekly epidemiological record**. No 8, 94, 85-104, 2019.

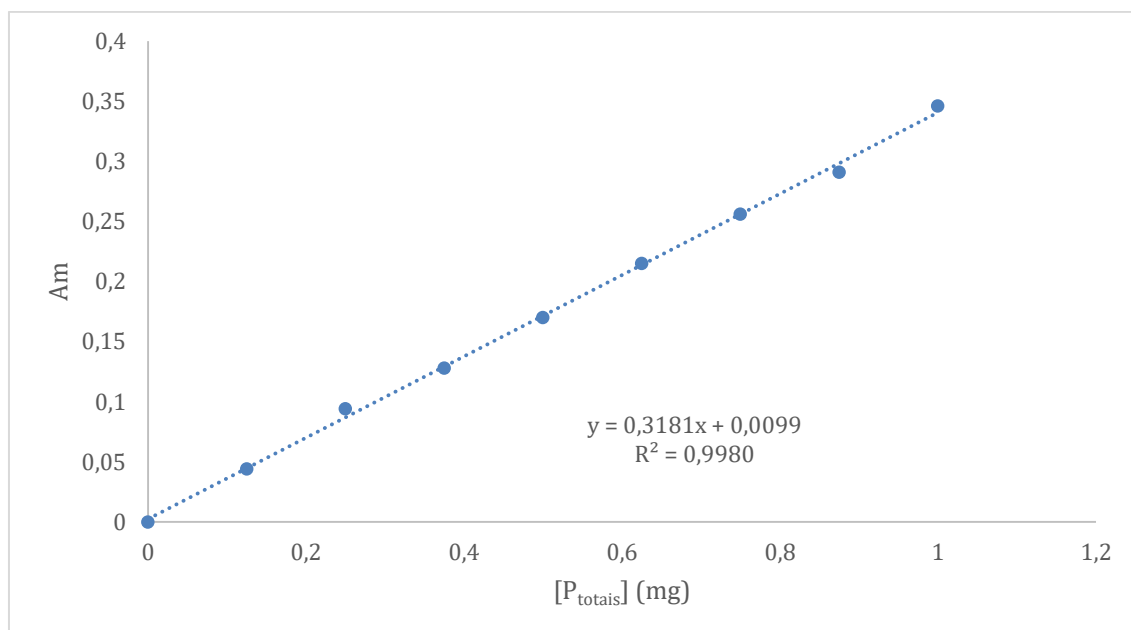
HAUSDORFF, W. P.; BRYANT, J.; PARADISO, P. R.; SIBER, G. R.. Which Pneumococcal Serogroups Cause the Most Invasive Disease: implications for conjugate vaccine formulation and use, part i. **Clinical Infectious Diseases**, v. 30, n. 1, p. 100-121, 1 jan. 2000.

YANG, J. A Pathway to Follow-on Biologics. **Hastings Sci. & Technol. Law J.** 3, 217, 2011.

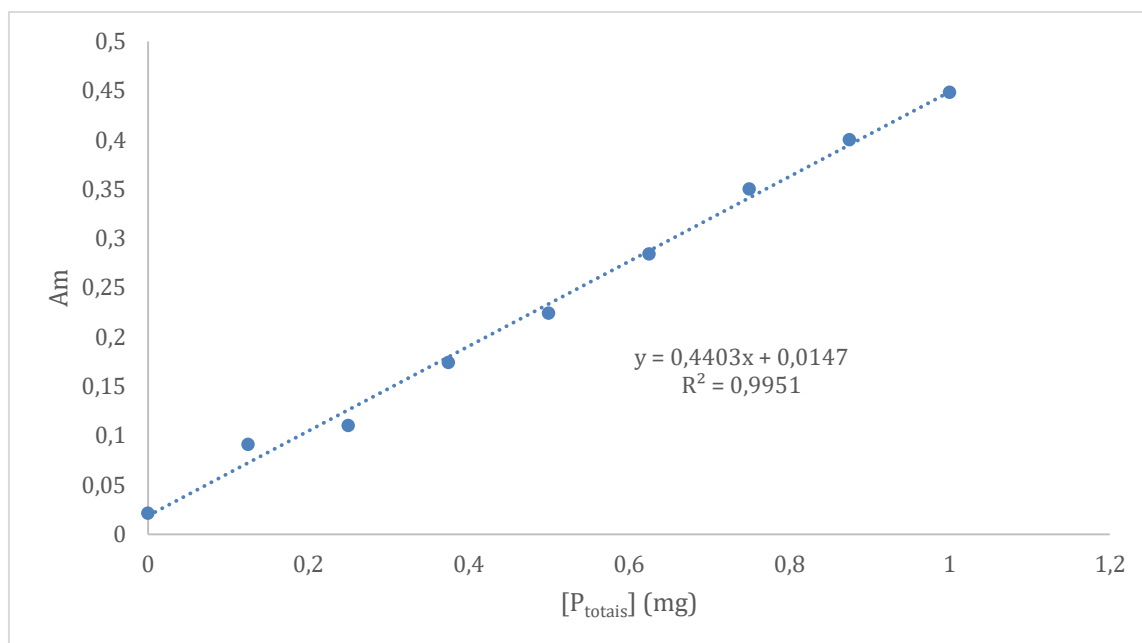
YOSHIOKA CR, MARTINEZ MB, BRANDILEONE MC, RAGAZZI SB, GUERRA ML, SANTOS SR, SHIEH HH, GILIO AE. Analysis of invasive pneumonia-causing strains of *Streptococcus pneumoniae*: serotypes and antimicrobial susceptibility. **J Pediatr** (Rio J). Jan-Feb;87(1):70-5. English, Portuguese. doi: 10.2223/JPED.2063. PMID: 21327303. 2011.

9. ANEXOS

Anexo 1. Curva de Absorbância versus concentração de proteínas totais obtida por leitura em leitor de placas a 280nm.



Anexo 2. Curva de Absorbância versus concentração de proteínas por leitura em leitor de placas em 595nm, método de Bradford



Anexo 3. Resultado obtido com o SDFA PPG-400/[Ch]Cl

Fase topo, rica em PPG-400 ←

Fase fundo, rica em [Ch]Cl ←

