

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

THIAGO DAVID DE PAIVA

**APLICAÇÃO DE PROCESSO ASSISTIDO POR
SIMULAÇÃO PARA A PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNA
RECOMBINANTE OBTIDA EM PLATAFORMA DE
EXPRESSÃO DETOXIFICADA**

SÃO CARLOS - SP
2024

THIAGO DAVID DE PAIVA

**APLICAÇÃO DE PROCESSO ASSISTIDO POR SIMULAÇÃO PARA A PURIFICAÇÃO DE
PROTEÍNA RECOMBINANTE OBTIDA EM PLATAFORMA DE EXPRESSÃO
DETOXIFICADA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos, para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientadora: Teresa Cristina Zangirolami

Coorientador: Leandro Junqueira Benedini

São Carlos - SP
2024



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Thiago David de Paiva, realizada em 19/08/2024.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Teresa Cristina Zangirolami (UFSCar)

Profa. Dra. Viviane Maimoni Gonçalves (IBSP)

Prof. Dr. Thiago Faggion de Pádua (UFSCar)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

A toda a minha família, que sempre me apoiou em todas as minhas
escolhas profissionais.
Ao meu avô Vicente, que partiu e deixou lindas memórias e
ensinamentos a mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da UFSCar (PPGEQ – UFSCar) e ao Instituto Butantan pelo auxílio concedido para o desenvolvimento deste trabalho de Mestrado. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – projetos 407716/2021-1 e 310973/2022-8).

Agradeço à minha orientadora, profa. Teresa Cristina Zangirolami, pela paciência, pela ajuda e por todo o conhecimento transmitido a mim durante o meu Mestrado. Destaco a educação e o respeito a mim ao fazer críticas.

Agradeço ao meu coorientador, prof. Leandro Junqueira Benedini, pela disponibilidade e por sempre ter me ajudado conforme a necessidade, principalmente, na compreensão e no tratamento dos dados envolvidos nas purificações feitas.

Agradeço à minha supervisora no Instituto Butantan, Viviane Maimoni Gonçalves, por ter me auxiliado no entendimento das etapas experimentais de um processo de purificação e ter executado algumas delas comigo, caso fosse preciso. Agradeço também aos técnicos de laboratório, alunos de pós-graduação e funcionários do Instituto Butantan que estiveram me acompanhando na execução dos experimentos e contribuíram de alguma forma.

Agradeço ao prof. Thiago Faggion de Pádua, que aceitou trabalhar comigo nos primeiros meses em que estive na UFSCar, fornecendo a mim um conhecimento adicional sobre as práticas experimentais vividas no cotidiano do laboratório.

Agradeço à minha mãe, Ana, e ao meu padrasto, Marcelo, por sempre terem se preocupado comigo, com meu irmão, Victor, e com o Gustavo em nome do nosso bem, independentemente de já termos atingido a fase adulta.

Agradeço aos novos amigos que fiz na UFSCar e na cidade de São Carlos, que me acolheram quando eu precisei e estiveram disponíveis para me ouvir, dar risadas junto comigo ou me dar um abraço na ausência da minha família. Em especial, cito a Ana Paula e o Leonardo, meus primeiros amigos do PPGEQ e, também, pós-graduandos na área de Engenharia Bioquímica. Cito também o João Arnosti do Departamento de Terapia Ocupacional, um amigo que fiz para toda a vida.

“Aprendi que não importa o que aconteceu, ou quanto tempo demore, você sempre precisa se levantar e seguir em frente – Whitney Houston”.

RESUMO

A produção de biofármacos, incluindo componentes vacinais, envolve o cultivo de células, nas quais o produto é sintetizado, seguido por uma sequência de etapas de recuperação e purificação cuja finalidade é eliminar as impurezas e obter o produto com a pureza necessária para uso terapêutico. Os custos das operações de purificação variam de 20 a 80% da despesa global do processo de obtenção de produtos biotecnológicos, sendo o fator determinante do preço da mercadoria final. No presente trabalho, foi realizada uma série de estudos para o desenvolvimento de um processo de purificação menos complexo e dispendioso da Proteína A de Superfície Pneumocócica (PspA4Pro), componente promissor para a formulação de vacinas antipneumocócicas, produzida por células de ClearColi®. Essa linhagem de *Escherichia coli* é geneticamente modificada, isenta de atividade endotóxica, oferecendo menos risco de reações adversas causadas pelas endotoxinas presentes nas linhagens convencionais de *E. coli* recombinante. O desenvolvimento de processos de purificação da proteína de interesse, sem a adição de *tag*, presente em clarificados celulares reais, permitindo seu escalonamento e sua aplicação em processos industriais, foi o principal objetivo do trabalho. Todas as biomassas utilizadas nos estudos foram obtidas em cultivos de ClearColi® realizados anteriormente, estando disponíveis *in loco*. Foi utilizada uma abordagem baseada na modelagem e simulação da principal etapa da purificação, a cromatografia de troca aniônica, para a seleção das condições ótimas de operação, sendo uma estratégia inovadora, econômica e mais rápida se comparada ao método de tentativa e erro utilizado em trabalhos anteriores para melhorar a eficiência do processo. Inicialmente, foram realizadas simulações do modelo matemático desenvolvido anteriormente para descrever a purificação da PspA4Pro obtida em cultivo de *E. coli* convencional por cromatografia de troca aniônica, as quais descreveram adequadamente as frações eluídas durante a purificação da mesma proteína obtida em cultivos de ClearColi®. Novas simulações do modelo foram então realizadas para definir estratégias promissoras de purificação, as quais foram conduzidas no Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas do Instituto Butantan, em São Paulo. Ao todo, foram executados seis processos de purificação, tendo como principais etapas: o rompimento celular por meio de um homogeneizador de alta pressão, com a pressão de operação variando entre 500 e 1200 bar; precipitação com brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) a 0,1% em massa por volume; clarificação por centrifugação a 10000 rpm por 1 hora a 10°C; cromatografia de troca aniônica do clarificado celular em resina Q-Sepharose acoplada a um cromatógrafo Äkta Avant 150 e crioprecipitação a pH 4,0 por um tempo mínimo de 24 horas a -20°C. O método do ácido bicinconínico (BCA) foi utilizado para a quantificação de proteínas solúveis totais e o SDS-PAGE para a obtenção da pureza da proteína de interesse com o uso da densitometria de bandas. O protocolo de eluição com concentrações de 100, 250 e 1000 mmol.L⁻¹ de NaCl foi aplicado, por ter se destacado como o mais eficiente de acordo com os resultados da simulação da cromatografia de troca aniônica realizada. Adotando-se essa estratégia de operação para a etapa cromatográfica, seguida do fracionamento da eluição na qual foi utilizada a concentração intermediária de NaCl e realizando-se, ainda, a crioprecipitação das subfrações iniciais da eluição mencionada foi possível atingir purezas acima de 95% da PspA4Pro. O trabalho revelou ainda que a obtenção de purezas mais elevadas da proteína desejada pode vir acompanhada de valores de recuperação mais baixos.

Palavras-chave: ClearColi®; purificação; cromatografia de troca aniônica; PspA4Pro.

ABSTRACT

The production of biopharmaceuticals, including vaccine components, involves the cultivation of cells in which the product is synthesized, followed by a sequence of recovery and purification steps which purpose is to eliminate impurities and obtain the product with the purity required for therapeutic use. The costs of purification operations vary from 20 to 80% of the overall cost of the process of obtaining biotechnological products, and are the determining factor in the price of the final product. In this study, a series of studies were carried out to develop a less complex and expensive purification process for Pneumococcal Surface Protein A (PspA4Pro), a promising component for the formulation of anti-pneumococcal vaccines, produced by ClearColi[®] cells. This *Escherichia coli* strain is genetically modified, free of endotoxic activity, offering less risk of adverse reactions caused by the endotoxins present in conventional *E. coli* strains. The development of purification processes for the protein of interest, without the addition of a tag, present in real cell clarification, allowing it to be scaled up and applied in industrial processes, was the main objective of the work. All the biomass used in the studies were obtained from previous ClearColi[®] cultivations and were available on site. An approach based on modeling and simulation of the main purification step, anion exchange chromatography, was used to select the optimum operating conditions, an innovative, economical and faster strategy compared to the trial and error method used in previous works to improve process efficiency. Initially, simulations of the mathematical model developed previously to describe the purification of PspA4Pro obtained in conventional *E. coli* culture by anion exchange chromatography were carried out, which adequately described the fractions eluted during the purification of the same protein obtained in ClearColi[®] cultures. New model simulations were then carried out to define promising purification strategies, which were conducted at the Vaccine Development Laboratory of Butantan Institute in São Paulo. Six purification processes were carried out, with the main stages being: cell disruption using a high-pressure homogenizer, with the operating pressure varying between 500 and 1200 bar; precipitation with cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) at 1 mg.mL⁻¹; clarification by centrifugation at 10000 rpm for 1 hour at 10°C; anion exchange chromatography of the cell clarified on Q-Sepharose resin coupled to an Äkta Avant 150 chromatograph and cryoprecipitation at pH 4.0 for a minimum of 24 hours at -20°C. The bicinchoninic acid (BCA) method was used to quantify total soluble proteins and SDS-PAGE was used to obtain the purity of the protein of interest using band densitometry. It was used the elution protocol with concentrations of 100, 250 and 1000 mmol.L⁻¹ of NaCl, which proved to be the most efficient according to the results of the anion exchange chromatography simulation. By adopting this operating strategy for the chromatographic stage, followed by fractionation of the elution in which the intermediate concentration of NaCl was used and cryoprecipitation of the initial sub-fractions of the elution mentioned, it was possible to achieve purities over 95% of PspA4Pro. The work also showed that obtaining higher purities of the desired protein can be accompanied by lower recovery values.

Keywords: ClearColi[®]; purification; anion exchange chromatography; PspA4Pro.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da PspA.	4
Figura 2 - Comparação dos LPS de <i>E. coli</i> convencional e ClearColi®.	6
Figura 3 - Desenho esquemático de um homogeneizador de alta pressão.	7
Figura 4 - Fórmula estrutural do CTAB.	9
Figura 5 - Etapas de purificação de uma proteína (P) por troca aniônica.	11
Figura 6 - Representação da transferência de massa de uma proteína em uma partícula esférica de resina.	14
Figura 7 - Esquema representativo da ligação de proteínas em uma superfície de troca catiônica.	17
Figura 8 - Diagrama de blocos do procedimento experimental adotado em nas purificações.	33
Figura 9 - Panda Plus, sistema utilizado para ruptura celular.	34
Figura 10 - Cromatógrafo Äkta Avant 150.	38
Figura 11 - Comparação entre o perfil obtido da purificação com ClearColi® e o modelo de Benedini <i>et al.</i> (2020).	49
Figura 12 - Frações da purificação P1 no gel 10% SDS-PAGE. A) Marcador molecular. B) Clarificado. C) QNAds. D) Q100. E) Q250_2. F) Q250_3. G) Q250_4. H) Q250_5. I) Q250_6. J) Q250_7.	50
Figura 13 - Frações da purificação P1 em dois géis 10% SDS-PAGE. As amostras de A a D são pertencentes a um gel e as de E e F, a outro gel. A) Marcador molecular. B) Q250_8. C) Q250_9. D) Q1000. E) Marcador molecular. F) Pool após a crioprecipitação.	51
Figura 14 - Frações da purificação P2 no gel 10% SDS-PAGE. A) Marcador molecular. B) Clarificado. C) Q250_4. D) Q250_5. E) Q250_6. F) Q250_7. G) Q250_8. H) Q250_9. I) Q250_10. J) Q1000.	55
Figura 15 - Frações da purificação P2 em três géis 10% SDS-PAGE. A) Marcador molecular. B) QNAds. C) Q100. D) Q250_2. E) Q250_3. F) Marcador molecular. G) Pool. H) Marcador molecular. I) Pool após a crioprecipitação.	55
Figura 16 - Frações da purificação P3 no gel 10% SDS-PAGE. A) Marcador molecular. B) Clarificado. C) Q300_2. D) Q300_3. E) Q300_4. F) Q300_5. G) Q300_6. H)	

Q300_7. I) Q300_8. J) Q300_9. 59

Figura 17 - Frações da purificação P3 em dois géis 10% SDS-PAGE. A) Marcador molecular. B) QNAds. C) Q150. D) Q1000. E) Marcador molecular. F) Pool após a crioprecipitação. 59

Figura 18 - Frações da purificação P4 no gel 12% SDS-PAGE. A) Marcador molecular contendo fosforilase (97 kDa), albumina (66 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (31 kDa), tripsina (21 kDa) e lactalbumina (14 kDa). B) Clarificado. C) Q250_2. D) Q250_3. E) Q250_4. F) Q250_5. G) Q250_6. H) Q250_7. I) Q250_8. J) Q250_9. 62

Figura 19 - Frações da purificação P4 em dois géis 12% SDS-PAGE. A) Marcador molecular. B) QNAds. C) Q100. D) Q250_10. E) Q1000. 62

Figura 20 - Frações da purificação P5 em dois géis 12% SDS-PAGE. A) Marcador molecular. B) Clarificado. C) QNAds. D) Q150. E) Q300_2. F) Q300_3. G) Q300_4. H) Marcador molecular. I) Q300_5. J) Q300_6. K) Q300_7. L) Q300_8. M) Q300_9. 65

Figura 21 - Frações da purificação P5 no gel 12% SDS-PAGE. A) Marcador molecular. B) Q300_10. C) Q1000. D) Pool. E) Pool após a crioprecipitação. F) Q300_2 após a crioprecipitação. G) Q300_3 após a crioprecipitação. H) Q300_4 após a crioprecipitação. I) Q300_5 após a crioprecipitação. 66

Figura 22 - Frações da purificação P6 no gel 10% SDS-PAGE. A) Marcador molecular. B) Clarificado. C) QNAds. D) Q100. E) Q250_1. F) Q250_10. G) Q1000. 69

Figura 23 - Frações da purificação P6 no gel 10% SDS-PAGE. A) Q250_2. B) Q250_3. C) Q250_4. D) Q250_5. E) Q250_6. F) Q250_7. G) Q250_8. H) Q250_9. I) Marcador molecular. 70

Figura 24 - Frações da purificação P6 no gel 10% SDS-PAGE. A) Pool. B) Pool após a crioprecipitação. C) Marcador molecular. D) Q250_1 após a crioprecipitação. E) Q250_9 após a crioprecipitação. F) Q250_10 após a crioprecipitação. 70

Figura 25 - Frações da purificação P6 no gel 10% SDS-PAGE. A) Marcador molecular. B) Pool. C) Pool após a crioprecipitação. D) Q250_2 após a crioprecipitação. E) Q250_3 após a crioprecipitação. F) Q250_4 após a crioprecipitação. G) Q250_5 após a crioprecipitação. H) Q250_6 após a crioprecipitação. I) Q250_7 após a crioprecipitação. J) Q250_8 após a crioprecipitação. 71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Cultivos realizados para produção e purificação de PspA4Pro.	28
Tabela 2 - Principais informações sobre as purificações realizadas.	32
Tabela 3 - Descrição da etapa de rompimento celular para cada biomassa.	35
Tabela 4 - Informações sobre a CTA feita em cada uma das purificações.	39
Tabela 5 - Resultados da P1. Biomassa obtida no cultivo 2, conduzido em meio complexo, com indução por IPTG 0,7 mmol.L ⁻¹ . Purificação realizada com protocolo de Benedini (2019).	52
Tabela 6 - Resultados da P2. Biomassa obtida no cultivo 3, conduzido em meio definido, com indução por IPTG 0,7 mmol.L ⁻¹ . Purificação realizada com protocolo de Benedini (2019).	56
Tabela 7 - Estudo da variação da temperatura e da DO durante a lise celular.	58
Tabela 8 - Resultados da P3. Biomassa obtida no cultivo 1, conduzido em meio complexo, com indução por IPTG 1,0 mmol.L ⁻¹ . Purificação realizada com protocolo de Figueiredo (2014).	60
Tabela 9 - Resultados da P4. Biomassa obtida no cultivo 3, conduzido em meio definido, com indução por IPTG 0,7 mmol.L ⁻¹ . Purificação realizada com protocolo de Benedini (2019).	64
Tabela 10 - Resultados da P5. Biomassa obtida no cultivo 3, conduzido em meio definido, com indução por IPTG 0,7 mmol.L ⁻¹ . Purificação realizada com protocolo de Figueiredo (2014).	67
Tabela 11 - Dados da crioprecipitação para a P5.	68
Tabela 12 - Resultados da P6. Biomassa obtida no cultivo 2, conduzido em meio complexo, com indução por IPTG 0,7 mmol.L ⁻¹ . Purificação realizada com protocolo de Benedini (2019).	72
Tabela 13 - Dados da crioprecipitação para a P6.	73
Tabela 14 - Balanço de massa de proteínas solúveis totais nas cromatografias.	75
Tabela 15 - Balanço de massa da PspA4Pro nas cromatografias.	75
Tabela 16 - Balanço de massa de proteínas solúveis totais após a crioprecipitação de cada pool representativo da eluição central.	76

Tabela 17 - Balanço de massa da PspA4Pro após a crioprecipitação de cada pool representativo da eluição central.	77
Tabela 18 - Comparação das cromatografias com a de Cardoso <i>et al.</i> (2022).	79
Tabela 19 - Comparação das crioprecipitações com a de Cardoso <i>et al.</i> (2022).	83

LISTA DE SIGLAS

BSA - Albumina Sérica Bovina
CTA - Cromatografia de Troca Aniônica
CTAB - Brometo de Cetiltrimetilamônio
DO - Densidade Ótica
G-CSF - Fator Estimulador de Colônias Granulocitárias
IAEE - Isoterma de Ação em Efeito Estérico
LPS - Lipopolissacarídeo
MED - Modelo do Equilíbrio Dispersivo
NGF - Fator de Crescimento Nervoso
PspA4Pro - Proteína A de Superfície Pneumocócica
RC - Rompimento Celular
TSLP - Linfopoiétina Estromal Tímica

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Fator estérico
c	Concentração de adsorbato na fase móvel (g/mL)
c_{ext}	Concentração da fase líquida externa (g/mL)
c_{sal}	Concentração de sal na fase líquida (g/mL)
D_a	Coefficiente de dispersão axial (cm ² /s)
ϵ_T	Porosidade total do sistema
F	Vazão volumétrica de eluente (mL/min)
k_{Ads}	Constante de adsorção
k_{Des}	Constante de dessorção
K_e	Constante de equilíbrio
L	Comprimento da coluna (cm)
N	Número de pratos teóricos da coluna
q	Quantidade de adsorbato retido na estrutura sólida em equilíbrio com a fase líquida (g/mL)
Q	Concentração de sal na fase sólida (g/mL)
Q_{NAds}	Fração não adsorvida pela coluna de troca aniônica
Q_{100}	Grupo proteico observado na eluição feita com 100 mmol.L ⁻¹ de NaCl
Q_{150}	Grupo proteico observado na eluição feita com 150 mmol.L ⁻¹ de NaCl
Q_{250}	Grupo proteico observado na eluição feita com 250 mmol.L ⁻¹ de NaCl
Q_{300}	Grupo proteico observado na eluição feita com 300 mmol.L ⁻¹ de NaCl
Q_{1000}	Grupo proteico observado na eluição feita com 1000 mmol.L ⁻¹ de NaCl
t_r	Tempo de retenção (min)
u	Velocidade da fase móvel (cm/s)
v	Número de sítios ligantes presentes na molécula do adsorbato
v_1	Coefficiente estequiométrico da proteína
v_2	Coefficiente estequiométrico do sal
V_r	Volume de retenção (mL)
$W_{1/2}$	Largura do pico correspondente à substância na metade de sua altura máxima
Λ	Número de sítios ativos ligantes disponíveis por volume de resina (mols/mL _{resina})

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1	Proteína A de Superfície Pneumocócica (PspA4Pro)	4
2.2	Clearcoli®	5
2.3	Purificação	6
2.3.1	Rompimento celular	7
2.3.2	Brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB)	8
2.3.3	Cromatografia de troca aniônica	10
2.3.3.1	Principais conceitos	10
2.3.3.2	Modelagem e simulação	12
2.4	Purificação de proteínas sem <i>tag</i> (<i>untagged</i>)	19
3	MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1	Produção da proteína de interesse	28
3.2	Estudos de purificação	29
3.2.1	Descrição geral do procedimento experimental	33
3.2.1.1	Rompimento celular (RC)	33
3.2.1.2	Precipitação com CTAB	35
3.2.1.3	Cromatografia de troca aniônica (CTA) em Q-Sepharose	36
3.2.1.4	Fracionamento da eluição central e caracterização	40
3.2.1.5	Crioprecipitação a pH 4,0	42
3.3	Métodos analíticos	43
3.3.1	Quantificação de proteínas solúveis totais pelo método BCA	43
3.3.2	Determinação da pureza da PspA4Pro por SDS-PAGE	45
3.4	Cálculos de balanço de massa, fator de purificação e rendimento	46
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1	Modelo para a cromatografia de troca aniônica aplicado à ClearColi®	48
4.2	Purificações	49
4.2.1	Purificação 1	50
4.2.2	Purificação 2	54
4.2.3	Análise da elevação da temperatura durante o rompimento celular	57
4.2.4	Purificação 3	58
4.2.5	Purificação 4	61
4.2.6	Purificação 5	65
4.2.7	Purificação 6	69
4.3	Análise comparada dos resultados das purificações	74
4.3.1	Balanço de massa	74
4.3.2	Cromatografia de troca aniônica	78
4.3.3	Crioprecipitação	82
5	CONCLUSÃO	84
	REFERÊNCIAS	85

1 INTRODUÇÃO

Streptococcus pneumoniae, agente causador de patologias como pneumonia, sinusite e meningite, é um micro-organismo Gram-positivo capaz de se ligar à lactoferrina, glicoproteína componente do sistema imune inato, impedindo a sua ação bactericida (SENKOVICH *et al.*, 2007). Sua membrana celular é recoberta por uma cápsula de polissacarídeos, a qual é o principal fator de virulência, cuja estrutura é responsável pela definição dos diferentes sorotipos existentes (MADHI; PELTON, 2008).

A imunização por meio de vacinas antipneumocócicas é a forma mais eficaz de prevenção das doenças causadas por *S. pneumoniae*. Todas as vacinas existentes no mercado são formuladas com a combinação de polissacarídeos de diferentes sorotipos, conjugados ou não a uma proteína, e apresentam cobertura limitada. Para que a cobertura de imunidade seja ampliada, uma nova vacina está sendo desenvolvida para o mercado nacional, com a finalidade de conjugar os polissacarídeos dos três sorotipos prevalentes no Brasil (14, 6B e 1) com a proteína A de superfície do pneumococo (PspA), presente na parede celular do pneumococo e exposta em sua cápsula polissacarídica (BARAZZONE *et al.*, 2011), que é a molécula-alvo do presente trabalho.

A produção de proteínas recombinantes em larga escala envolve o cultivo do micro-organismo produtor da proteína de interesse, seguido por uma sequência de etapas de purificação para obtenção do produto dentro das especificações definidas para insumos farmacêuticos. Esses processos de purificação contribuem com até 80% dos custos totais de produção (BANKI *et al.*, 2005). Embora potencialmente aceitáveis para produtos de alta qualidade, esses custos representam um obstáculo para a fabricação em grandes quantidades de vacinas para beneficiar populações inteiras em países com diferentes potenciais de investimento. Portanto, o desenvolvimento de processos de purificação simples e confiáveis para proteínas recombinantes representa um objetivo importante na produção de vacinas.

De maneira geral, a purificação da proteína de interesse não é uma tarefa simples. O extrato celular clarificado obtido após as primeiras etapas do processo de purificação é uma mistura complexa, contendo várias proteínas diferentes, além da proteína de interesse, juntamente com outros componentes celulares solúveis (como polissacarídeos, DNA e RNA). *Tags* (ou caudas, em português) são estruturas

químicas frequentemente adicionadas a proteínas recombinantes durante a clonagem para facilitar o processo de purificação em escala de bancada. Podem ainda contribuir para melhorar o rendimento da purificação, aumentar a solubilidade e auxiliar o redobramento das cadeias proteicas. No entanto, as *tags* podem ter efeitos prejudiciais como alteração da conformação das proteínas, mudança da atividade biológica e toxicidade (ARNAU *et al.*, 2006). Além disso, a presença das *tags* no produto final não é permitida pelas normas das agências reguladoras. Portanto, etapas adicionais precisam ser incluídas nos processos de purificação em larga escala para remoção das *tags*, que podem possuir custos elevados.

Desta forma, no presente trabalho, estudou-se o desenvolvimento de processos de purificação da proteína de interesse sem a adição de *tag*, permitindo seu escalonamento e sua aplicação em processos industriais.

Uma das etapas dos processos de purificação desenvolvidos no trabalho é a cromatografia de troca aniônica, processo de alto custo devido ao alto valor de mercado da resina cromatográfica (FIGUEIREDO, 2014).

Em razão do fato mencionado, é interessante o estudo direcionado à modelagem e simulação desta etapa como estratégia para identificar pontos de otimização de pureza e rendimento. Por meio da modelagem, é possível realizar a descrição do processo com equações matemáticas visando a representar os comportamentos adsorventes das proteínas e os fenômenos de transferência de massa. O modelo gerado pode então ser empregado para simular diferentes condições de operação da cromatografia de troca aniônica, gerando grande quantidade de dados, com mínimo esforço experimental (BENEDINI, 2019).

Assim, neste projeto de pesquisa foi utilizada uma estratégia inovadora baseada na modelagem e simulação da cromatografia de troca aniônica para a purificação de PspA4Pro obtida de cultivos de ClearColi[®], uma linhagem recombinante de *Escherichia coli* isenta de atividade endotóxica. As condições experimentais foram selecionadas a partir dos estudos *in silico* da cromatografia de troca aniônica, objetivando maximizar a pureza (BENEDINI *et al.*, 2020).

Os objetivos específicos do trabalho incluíram:

- A avaliação da influência das condições de cultivo para a obtenção da biomassa no desempenho dos processos de purificação;

- A análise do desempenho do modelo desenvolvido por Benedini (2019) para a cromatografia de troca aniônica de clarificados celulares da *E. coli* convencional na descrição dos clarificados celulares da ClearColi®;

- A comparação de diferentes estratégias de execução da etapa de cromatografia de troca aniônica.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

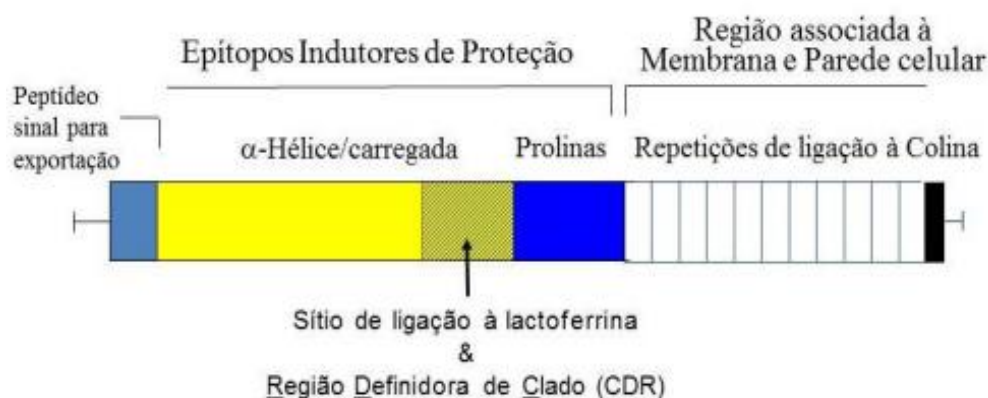
2.1. Proteína A da superfície de pneumococo (PspA)

A PspA é uma proteína presente na parede celular da bactéria patogênica *Streptococcus pneumoniae*, cujos resultados de proteção da vacina resultante em diversos modelos animais são muito promissores (FIGUEIREDO, 2014).

Ela é encontrada em todos os isolados de pneumococos. Trata-se de uma molécula responsável pela virulência da bactéria. Está ancorada na parede bacteriana, com parte de sua superfície exposta para além da cápsula (FIGUEIREDO, 2014).

Seu tamanho varia de 67 a 99 kDa, dividida em 5 diferentes áreas: um peptídeo sinal de exportação; uma região N-terminal em α -hélice; uma região rica em prolina; uma região com uma repetição de 20 aminoácidos, altamente conservada; e uma porção C-terminal com poucos resíduos hidrofóbicos, como mostra a Figura 1 (YOTHER *et al.*, 1992).

Figura 1 – Estrutura da PspA.



Fonte: Adaptado de Yother *et al.* (1992).

A PspA foi dividida em 3 famílias com base na homologia e no alinhamento da sequência de aminoácidos da região N-terminal imediatamente anterior à área rica em prolina, a região definidora de clado (CDR).

As famílias foram subdivididas em 6 clados. A família 1 inclui os clados 1 e 2; a família 2, os clados 3, 4 e 5; e a família 3, o clado 6. A maior parte dos isolados expressa PspA de família 1 ou 2, com raros pneumococos com PspA de família 3

(HOLLINGSHEAD *et al.*, 2000).

Comprovou-se que a PspA de clado 4 (PspA4) e a PspA de clado 5 (PspA5) induzem anticorpos com alta reatividade cruzada com as outras PspA, mediando a deposição de moléculas do sistema complemento na superfície da bactéria. Estas duas variantes da PspA seriam, desta forma, importantes candidatas vacinais capazes de estimular a proteção contra várias cepas de pneumococo (MORENO *et al.*, 2010).

2.2. ClearColi®

A linhagem *E. coli* BL21(DE3) ClearColi® (LGC Biosearch Technologies, Middlesex, Reino Unido), aqui denominada simplesmente ClearColi®, foi desenvolvida com o objetivo de amenizar uma das principais limitações da utilização de *E. coli* como hospedeiro para a expressão das proteínas de interesse: a presença da molécula de lipopolissacarídeo (LPS), também conhecida como endotoxina (PLANESSE *et al.*, 2015).

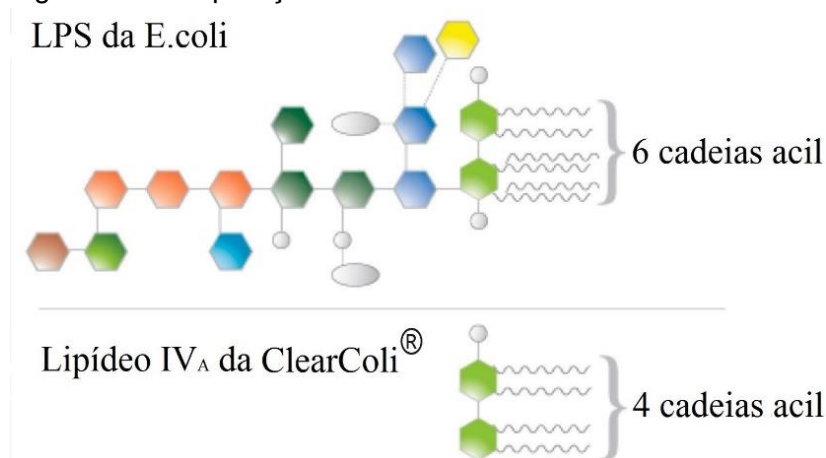
Nos mamíferos, o LPS pode induzir uma resposta pirogênica e em casos mais graves, causar choque séptico. Desta maneira, o contaminante LPS deve ser removido de proteínas recombinantes terapêuticas obtidas em *E. coli* antes de serem administradas com segurança em pacientes humanos e animais (PLANESSE *et al.*, 2015).

Contudo, os métodos de remoção de LPS, como ultrafiltração e adsorção em carbono ativado, apresentam baixa eficiência e seletividade insatisfatória. Uma alternativa a esses recursos é a introdução de modificações genéticas na *E. coli* para eliminar a resposta endotóxica em células humanas. As células de ClearColi® possuem um LPS geneticamente modificado que não causa uma reação adversa no organismo humano, sendo obtido por meio de sete deleções genéticas irreversíveis (MAMAT *et al.*, 2015).

Nas células, as duas cadeias acil secundárias do LPS normalmente hexa-acilado da *E. coli* são deletadas, as quais são a chave determinante da endotoxicidade nas células eucarióticas, dando origem ao lipídeo IV_A, conforme é apresentado na Figura 2. A cadeia de oligossacarídeos também é removida, tornando mais fácil a retirada do lipídeo IV_A do produto final obtido na purificação. Além disso, ocorre a introdução de duas mutações para manter a viabilidade das células

(CLEARCOLI, 2022).

Figura 2 – Comparação dos LPS de *E. coli* convencional e ClearColi®.



Fonte: Adaptado de ClearColi® (2022).

2.3. Purificação

A purificação pode ser dividida em quatro etapas genéricas: separação de células e seus fragmentos do meio de cultivo (clarificação); concentração e/ou purificação de baixa resolução, acontecendo a separação da proteína de interesse em relação a substâncias com propriedades físico-químicas bastante diferentes; purificação de alta resolução, compreendendo o isolamento da molécula-alvo de classes de moléculas com características físico-químicas semelhantes; e, por fim, operações para o acondicionamento final do produto (PESSOA; KILIKIAN, 2005).

A definição do método de purificação depende da aplicação final da molécula-alvo, seus aspectos físico-químicos, bem como aqueles das impurezas. No caso dos produtos farmacêuticos, tanto diagnósticos quanto terapêuticos, é requerido um maior grau de pureza e, dessa forma, a complexidade do sistema de purificação é elevada, possuindo um custo que pode chegar a 80% do custo final do produto (HARRISON, 1994).

Numa abordagem racional, a primeira estratégia para reduzir o número de operações e perdas no processo seria identificar as condições ótimas em cada etapa, especialmente nas mais caras e iniciais, e somente incluir as fases sucessivas caso sejam necessárias para atingir a pureza desejada. A escolha das operações na purificação de baixa resolução e de alta resolução também são determinantes no sucesso do processo. Como exemplo, é possível citar as etapas cromatográficas, que devem ser aplicadas na sequência mais adequada (HARRISON, 1994).

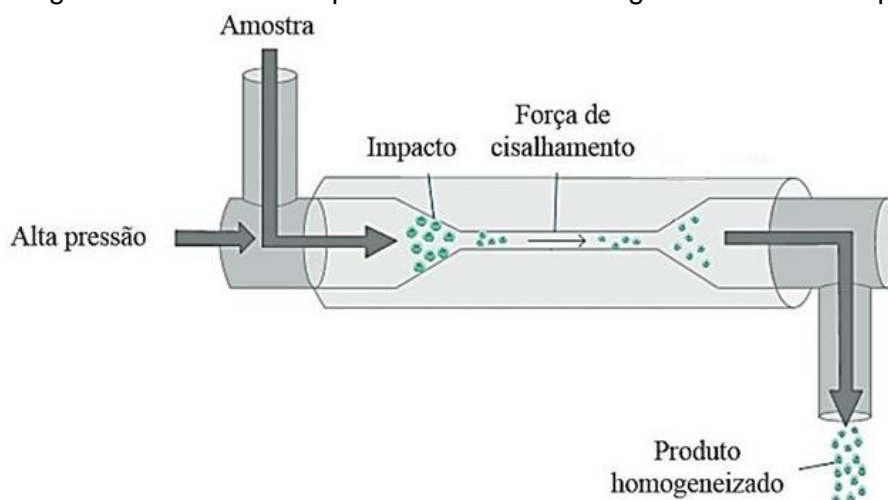
2.3.1. Rompimento celular

Para produtos presentes no interior das células, é necessário efetuar o rompimento celular, procedimento realizado sobre a suspensão concentrada de células obtida após a remoção ou separação do meio de cultivo. Como consequência, durante o rompimento, ocorre aumento da viscosidade da suspensão como resultado da liberação de nucleotídeos e a molécula-alvo é liberada juntamente com todas as outras moléculas intracelulares, ampliando a diversidade de contaminantes e tornando o processo de purificação mais complexo (HARRIS *et al.*, 1994).

No presente trabalho, foi utilizado um método mecânico para executar a ruptura celular, utilizando o homogeneizador de alta pressão. O equipamento é constituído por pistões projetados para aplicar altas pressões, forçando a passagem da suspensão celular por um orifício estreito seguida de colisão contra um anel de impacto. A diminuição instantânea da pressão gera a força de cisalhamento responsável por romper a parede celular sem danificar biomoléculas, resultando no homogenato recirculado no sistema (PESSOA; KILIKIAN, 2005).

O tipo de rompimento em questão desencadeia aumento da temperatura do meio e, por causa disso, o homogeneizador deve possuir um sistema eficiente de refrigeração, principalmente, nos em que a molécula-alvo é termossensível. O calor gerado no processo pode elevar a temperatura em 1,5°C para cada 1000 psi de pressão de operação (PESSOA; KILIKIAN, 2005). A Figura 3 ilustra o esquema de um homogeneizador de alta pressão.

Figura 3 – Desenho esquemático de um homogeneizador de alta pressão.



Fonte: Adaptado de Cho *et al.* (2012).

Entre os principais fatores que afetam o desempenho do homogeneizador é possível citar a pressão de operação, a velocidade de alimentação, a temperatura, o estado fisiológico do micro-organismo, o tipo de célula e sua concentração. A quantidade de células rompidas é proporcional à pressão na alimentação (PESSOA; KILIKIAN, 2005).

Após a ruptura celular, é gerada uma suspensão contendo material solúvel que inclui, por exemplo, proteínas, DNA, RNA e polissacarídeos, juntamente com material insolúvel, o qual corresponde aos debris celulares. Para a remoção dos fragmentos, a suspensão segue para etapas de precipitação ou centrifugação, que são operações de separação de baixa resolução, e, posteriormente, é conduzida às etapas cromatográficas (HARRISON, 1991).

2.3.2. Precipitação com brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB)

O termo precipitação é usado para descrever a operação em que uma perturbação em uma solução proteica, física ou química, causa a formação de partículas insolúveis de proteína, recuperadas posteriormente por uma operação de separação sólido-líquido. Trata-se de um método de concentração e utilizado antes da aplicação de operações de alta resolução na purificação (GLATZ, 1990).

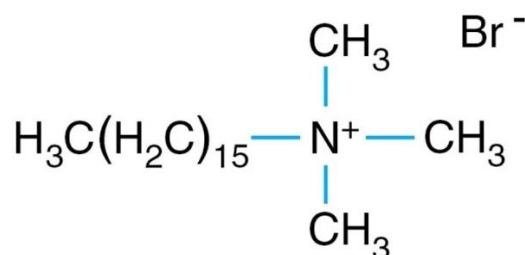
O precipitado pode ser a molécula de interesse ou não. Caso não seja, um sobrenadante mais límpido é formado no qual o produto de interesse estará diluído (HILBRIG, 2003). Neste caso, a precipitação é um procedimento de concentração dos contaminantes.

Proteínas precipitadas possuem a estrutura tridimensional modificada. Trata-se, portanto, de um procedimento agressivo para essas biomoléculas, pois sua função é dependente da estrutura. Dessa forma, precipitar a proteína de interesse é arriscado, e somente viável quando é possível recuperar a conformação adequada da proteína após o uso da técnica (SCOPES, 1994).

O brometo de cetiltrimetilamônio, do inglês, CTAB (*Cetyltrimethylammonium bromide*), cuja estrutura molecular está mostrada na Figura 4, é um surfactante catiônico recomendado pela *World Health Organization* como um agente de purificação no processamento de vacinas de polissacarídeos. Ele é responsável por remover os lipídeos da membrana celular e promover a lise da célula, sendo capaz de favorecer a liberação dos polissacarídeos e sua precipitação (NOVO NORDISK,

2022).

Figura 4 – Fórmula estrutural do CTAB.



Fonte: Hampton Research (2022).

Dentre os principais fatores que afetam a precipitação por CTAB, destacam-se a temperatura, o pH e a concentração do tensoativo utilizada, parâmetros essenciais na determinação de uma condição ótima de operação com baixa perda por desnaturação, devendo ser estudados conjuntamente (FIGUEIREDO, 2014).

A temperatura é uma das variáveis que merece maior atenção, devido à possibilidade de desnaturação das proteínas, principalmente, em temperaturas acima de 10°C. Em altas concentrações do agente precipitante, pode haver a desnaturação mesmo em baixas temperaturas. A adição do CTAB a um meio aquoso causa liberação de calor e aumento da temperatura e, por isso, deve ser feita lentamente e sobre resfriamento (SCHUBERT; FINN, 1981).

Com relação à maneira como o pH afeta a precipitação por CTAB, é necessário realizar o estudo acerca do ponto isoelétrico da proteína, que pode ser definido como o pH em que ela possui carga global igual a zero, sendo o valor igual ou próximo do pH de solubilidade mínima, em que as moléculas possuirão maior chance de se agregar devido à atração eletrostática. No caso de não ser desejado precipitar a proteína de interesse, o pH não deve estar em torno do ponto isoelétrico pois nesta situação as propriedades polares da proteína são minimizadas, fazendo com que ela fique menos solúvel (FIGUEIREDO, 2014).

No estudo feito por Figueiredo (2014) foi empregada a precipitação com CTAB para concentração de impurezas seguida pela remoção do precipitado por centrifugação antes da realização de uma série de cromatografias na purificação da PspA, que permaneceu na fração solúvel. Os resultados do estudo mencionado mostraram o aumento da pureza da PspA4Pro antes das etapas cromatográficas por

meio da precipitação com CTAB. Todavia, a concentração do surfactante a ser usada variou de acordo com as características do material de partida e precisou ser estimada no início do processo de purificação para minimizar as perdas em proteína de interesse nesta etapa.

2.3.3. Cromatografia de troca aniônica

2.3.3.1. Principais conceitos

As operações cromatográficas têm por objetivo purificar a molécula de interesse em relação às demais, conduzindo-a à pureza adequada a seu uso. A separação de moléculas por processos cromatográficos é, na maioria das vezes, baseada em fenômenos de adsorção, que de maneira resumida dizem respeito ao acúmulo de uma substância sobre a superfície de outra (CIOLA, 1998).

A cromatografia líquida pode ser executada de duas formas: a clássica, feita em colunas de vidro sob pressão atmosférica, quando há escoamento por gravidade; e a de pressões controladas, utilizando colunas conectadas a bombas. Este último caso é a configuração mais comum em processos de purificação modernos (COLLINS, 2006).

Em sua forma mais comum no bioprocessamento, os contaminantes proteicos correspondem aos solutos presentes em um meio líquido, os quais são retidos no processo em um leito de material poroso, denominado como a fase estacionária, que pode ser constituída por sílica porosa, polímeros orgânicos sintéticos, polímeros de carboidratos, etc. A posterior remoção paulatina dos distintos solutos é realizada por intermédio da ação da fase líquida eluente ou fase móvel, com a migração diferencial dos solutos entre as duas fases, resultando no fracionamento dos diversos componentes do meio (PESSOA; KILIKIAN, 2005).

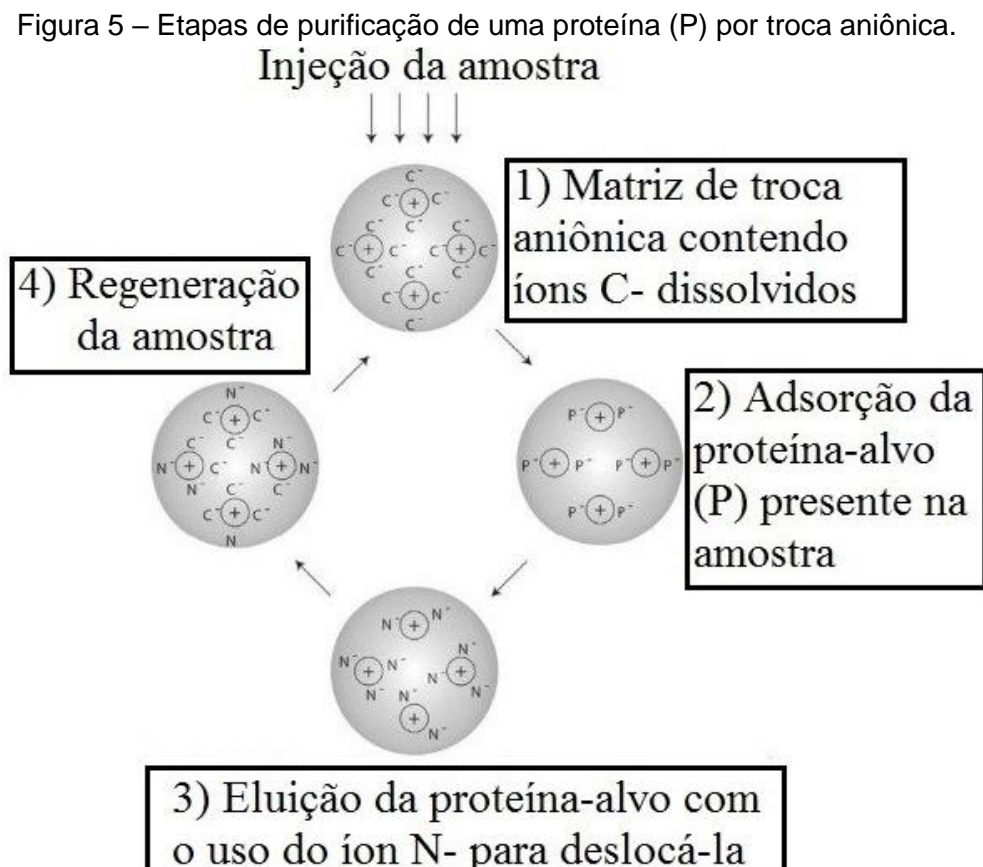
Em relação à fase estacionária, a matriz ideal na cromatografia líquida de proteínas deve ser insolúvel e conter grupos ligantes às proteínas de interesse. Deve também possuir estabilidade química, física, e rigidez necessária para permitir altos fluxos de fase móvel em colunas empacotadas por partículas pequenas (PESSOA; KILIKIAN, 2005).

A cromatografia de troca iônica é uma técnica comum usada na purificação de proteínas, em virtude de apresentar, quando comparada a outras técnicas de

purificação, simplicidade, fácil ampliação de escala, alta resolução, alta capacidade de adsorção e versatilidade (COLLINS *et al.*, 1990).

No tipo de cromatografia mencionado, ocorre uma etapa de adsorção reversível de moléculas de solutos eletricamente carregados a grupos com cargas opostas, imobilizados em matriz sólida. Os solutos adsorvidos são, seguidamente, eluídos depois de serem trocados por outros íons, de mesma carga, contudo, com maior afinidade pela fase estacionária. Em outras palavras, ocorre a competição entre os íons de interesse e os contaminantes pelos grupos carregados da matriz (AMERSHAM-PHARMACIA BIOTECH, 1999).

As matrizes de troca iônica que contém grupos positivamente carregados são denominadas trocadores aniônicos e adsorvem proteínas com carga líquida negativa, enquanto as que são negativamente carregadas são chamadas de trocadores catiônicos, adsorvendo proteínas com carga líquida positiva. Os contra-íons são íons de baixa massa molar que se ligam à fase estacionária ou às proteínas solúveis na fase móvel (PESSOA; KILIKIAN, 2005). A Figura 5 ilustra as etapas da cromatografia de troca aniônica.



Fonte: Adaptado de Pessoa; Kilikian (2005).

A distribuição das cargas nas superfícies das proteínas é determinada pelo seu ponto isoelétrico (pI) e pelo pH do sistema. Em situações com pH acima do pI as proteínas se tornam carregadas negativamente. O inverso ocorre nos casos cujo pH do sistema se encontra abaixo do pI (JANSON, 2012).

A escolha do tipo de trocador iônico dependerá da estabilidade da proteína em função do pH a ser empregado e da natureza dos contaminantes. Quando a biomolécula é mais estável em pH acima do pI, deve ser usado um trocador aniônico (HARRISON, 1994).

Depois da troca dos contraíons ligados ao trocador iônico pela molécula-alvo, ocorre aumento da força iônica da solução, sendo possível a alteração do pH e, conseqüentemente, a desnaturação da proteína. Devido a isso, a fase móvel no processo de troca iônica deve ser tamponada para minimizar a flutuação do pH e também determinar a carga líquida superficial da proteína de modo a promover o equilíbrio entre as fases estacionária e móvel (JANSON, 2012).

O pH do tampão pode ser ajustado para favorecer a adsorção ou a eluição da amostra, pois tem a capacidade de mudar a carga líquida superficial da proteína e do trocador iônico. Para a adsorção da biomolécula, o pH deve ser em torno de uma unidade abaixo ou acima do seu pI, ocorrendo a dissociação quando o pH da fase móvel estiver a 0,5 unidade de diferença do pI (PYLE, 1990).

A força iônica do tampão utilizado na troca iônica é usada para controlar o grau de bloqueio dos grupos ionogênicos da proteína a ser purificada. Na etapa de adsorção deve ser empregada a maior força iônica que permita a máxima adsorção da proteína à matriz, e na eluição, a menor força iônica possível para a dessorção (PYLE, 1990).

Após o estabelecimento das melhores condições de pH e força iônica de adsorção e eluição, devem ser considerados alguns fatores importantes, sendo o pré-tratamento da matriz, para a eliminação de impurezas, intumescimento (quando a matriz for adquirida na forma seca), lavagem e acondicionamento do contraíon; e o modo de adsorção e eluição da proteína de interesse (WHEEWRIGHT, 1994).

2.3.3.2. Modelagem e simulação

Assim como na maioria dos processos químicos e operações unitárias, a cromatografia também pode ser representada por meio de modelos matemáticos,

podendo ser muito útil ao experimentador, uma vez que possibilita estudo mais detalhado da técnica em menos tempo e com menor esforço experimental, além de viabilizar otimizações e escalonamentos (GUIOCHON *et al.*, 2006).

Um cromatograma é um gráfico indicador da presença dos diferentes solutos no eluente saindo da coluna (ordenada), em função do tempo ou do volume de eluente que passou pela coluna (abscissa). A presença dos distintos solutos é detectada por medidas de absorvância (UV, visível ou fluorescência) ou por índice de refração efetuada no eluente.

O volume que passa pela coluna até o instante de saída de uma certa molécula é o volume de retenção específico daquela molécula (V_r). Também pode ser empregado o tempo de retenção (t_r) de forma alternativa ao volume. As grandezas t_r e V_r podem ser relacionadas pela Equação 1, em que F é a vazão volumétrica do eluente (CIOLA, 1998).

$$V_r = F \cdot t_r \quad (1)$$

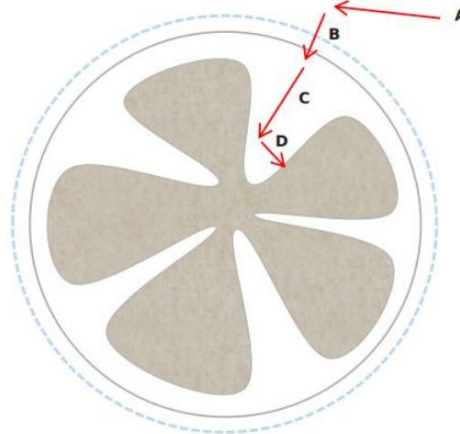
A eficiência no isolamento de uma certa molécula pode ser avaliada pela estimativa de N , o número de estágios teóricos da coluna, dependente do tempo de retenção (t_r) e da largura do pico da curva correspondente à substância na metade de sua altura máxima ($W_{1/2}$). N é calculado pela Equação 2 (CIOLA, 1998).

$$N = 5.54 \left(\frac{t_r}{W_{1/2}} \right)^2 \quad (2)$$

A utilização de modelos matemáticos permite prever o comportamento de um cromatograma sem a realização de experimentos. Para que os modelos cromatográficos sejam melhor explorados, devem ser compreendidos os fenômenos de transferência de massa que ocorrem durante a adsorção, sendo necessária a relativa proximidade do adsorbato ao adsorvente para a ocorrência da interação (GUIOCHON *et al.*, 2006).

A Figura 6 descreve esquematicamente o caminho percorrido pelo adsorbato para a interação com a matriz sólida. A primeira barreira é representada pela difusividade na fase líquida até as proximidades da partícula de adsorvente (A), seguido pela resistência à transferência de massa imposta pela película de líquido estagnado em volta da parede da matriz sólida (B) e pela difusividade no interior do sólido (C), para que finalmente ocorra a interação entre o adsorvente e o adsorbato (D), podendo ser de natureza física ou química (FINETTE, 1997; GUIOCHON, 2006).

Figura 6 – Representação da transferência de massa de uma proteína em uma partícula esférica de resina.



Fonte: Benedini (2019).

Nos próximos parágrafos, é apresentado um modelo matemático para descrever os processos cromatográficos, sendo o Modelo do Equilíbrio Dispersivo (MED). No presente trabalho, foi feita a simulação da etapa de cromatografia de troca aniônica utilizando o MED. Apesar da existência de modelos mais complexos com maior capacidade descritiva do processo em comparação ao MED, tais modelos possuem uma quantidade maior de parâmetros a serem determinados com confiança, exigindo muitos dados e, às vezes, dados específicos, que são difíceis de obter em clarificados celulares reais (BENEDINI, 2019).

O MED deve ser aplicado em situações em que a dispersão axial tem influência relevante na transferência de massa. Este modelo pode ser descrito pela Equação 3, representando o balanço de massa em um prato teórico da coluna cromatográfica, onde c é a concentração de adsorbato na fase móvel (g/mL), q é a quantidade de adsorbato retido na estrutura sólida em equilíbrio com a fase líquida (g/mL resina), u é a velocidade da fase móvel (cm/s) e ϵ_T é a porosidade total do sistema (GRITTI *et al.*, 2013; GUIOCHON, 2006). D_a (cm²/s) representa o coeficiente de dispersão axial (KACZMARSKI *et al.*, 2001; GUIOCHON, 2006). Caso seja utilizado o cromatograma para a determinação de D_a , este valor se torna aparente, incluindo efeitos de resistência ao transporte de massa na dispersão axial.

$$\frac{\partial c}{\partial t} + \frac{1 - \epsilon_T}{\epsilon_T} \frac{\partial q}{\partial t} + u \frac{\partial c}{\partial z} = D_a \frac{\partial^2 c}{\partial z^2} \quad (3)$$

Se for observada a Figura 6, é possível dizer que o principal efeito considerado pelo MED é a difusão mássica no líquido (A), aspecto diretamente relacionado à

dispersão axial. O MED também propõe D_a constante em todo o comprimento da coluna, na condição de a velocidade de escoamento da fase móvel ser mantida (DONAT *et al.*, 2018; GUIOCHON, 2006).

Em princípio, D_a pode ser estimado pela Equação 4, em que L é o comprimento da coluna e N_t é o número total de pratos teóricos.

$$D_a = \frac{Lu}{2N_t} \quad (4)$$

Apesar de simples, o MED tem sido utilizado com sucesso para modelar colunas cromatográficas. Close *et al.* (2014) utilizaram o MED para prever o perfil cromatográfico de uma proteína separada por cromatografia hidrofóbica. As previsões apresentaram menos de 3% de desvio dos dados experimentais. Teoh *et al.* (2001) também utilizaram esse modelo para descrever o perfil cromatográfico da separação de uma biomolécula num HPLC e conseguiram ajustar bem o modelo proposto aos cromatogramas experimentais.

O modelo apresentado considera que o processo de adsorção entra em equilíbrio com a matriz sólida a cada secção da coluna. Esta condição foi representada por q , uma variável possível de ser correlacionada com a concentração da fase líquida externa (c_{ext}), com a qual se encontra em equilíbrio por meio de uma isoterma de adsorção, conforme mostra de forma genérica a Equação 5 (BENEDINI, 2019).

$$q = f(c_{ext}) \quad (5)$$

As isotermas de adsorção possuem a função de complementar os modelos, fornecendo ao sistema condições de definir a quantidade de adsorbato na fase líquida ou efetivamente adsorvida na resina (BENEDINI, 2019). Nos próximos parágrafos, são apresentados os conceitos teóricos da *Steric Mass Isotherm* (SMA), aqui denominada de Isoterma de Ação em Efeito Estérico (IAEE), a qual foi utilizada em conjunto com o MED no presente trabalho para descrever a cromatografia de troca aniônica.

Em trabalhos recentes, autores tem utilizado com sucesso a IAEE para retratar a interação entre proteínas e resinas iônicas. Uma das grandes vantagens é que a abordagem teórica desta isoterma considera competição entre o sal e as múltiplas proteínas presentes no meio de adsorção, uma situação bastante comum quando se trabalha com a separação de misturas proteicas reais (GUIOCHON *et al.*, 2006; GU,

2015; HUUK *et al.*, 2014; KARKOV *et al.*, 2013).

No trabalho de Benedini *et al.* (2020), foi realizada a modelagem da cromatografia de troca aniônica no processamento de misturas proteicas reais, sendo a proteína-alvo a ser purificada a PspA4Pro. Foi aplicada a IAEE em complemento ao Modelo do Equilíbrio Dispersivo. As equações do modelo e da isoterma foram usadas para descrever separadamente o perfil da PspA4Pro e do conjunto de impurezas proteicas eluídas no mesmo momento. Os resultados das simulações mostraram que a IAEE representava adequadamente os cromatogramas das misturas proteicas complexas e, além disso, evidenciaram que a PspA4Pro tendia a eluir no início do pico, permitindo estabelecer um esquema de eluição alternativo proporcionando um aumento de 34% na pureza alcançada.

Para ser compreendida a base teórica relacionada ao desenvolvimento da IAEE, será considerada inicialmente uma situação de equilíbrio sólido-líquido entre uma proteína (1) e um determinado sal (2). A reação genérica representada abaixo (6) descreve bem esta situação, onde v_1 e v_2 são os coeficientes estequiométricos da proteína e do sal, respectivamente; Q e c_{sal} são as concentrações de sal nas fases sólidas e líquida, respectivamente, e q e c são as concentrações de proteína nas fases sólidas e líquida. Todas as concentrações são expressas em mol/mL ou mol/mL resina (GALLANT, 1995; GUIOCHON *et al.*, 2006; GU, 2015).



Se todos os coeficientes estequiométricos forem divididos por v_2 será obtida a reação química representada em 7. É denominado v como o número de sítios ligantes presentes na molécula do adsorbato. Sendo assim, a constante de equilíbrio pode ser representada pela Equação 8, cujo desenvolvimento leva à Equação 9.



$$K_{eq} = \frac{k_{Ads}}{k_{Des}} = \frac{q c_{sal}^v}{c Q^v} \quad (8)$$

$$k_{Ads} c Q^v = k_{Des} q c_{sal}^v \quad (9)$$

No entanto, o desenvolvimento teórico da IAEE considera que as fases sólida e líquida não se encontram em equilíbrio. Em situações de não equilíbrio, a diferença entre os termos adsortivos e dessortivos não pode ser nula. Por isso, a Equação 9 é corrigida à situação de não equilíbrio representada pela Equação 10.

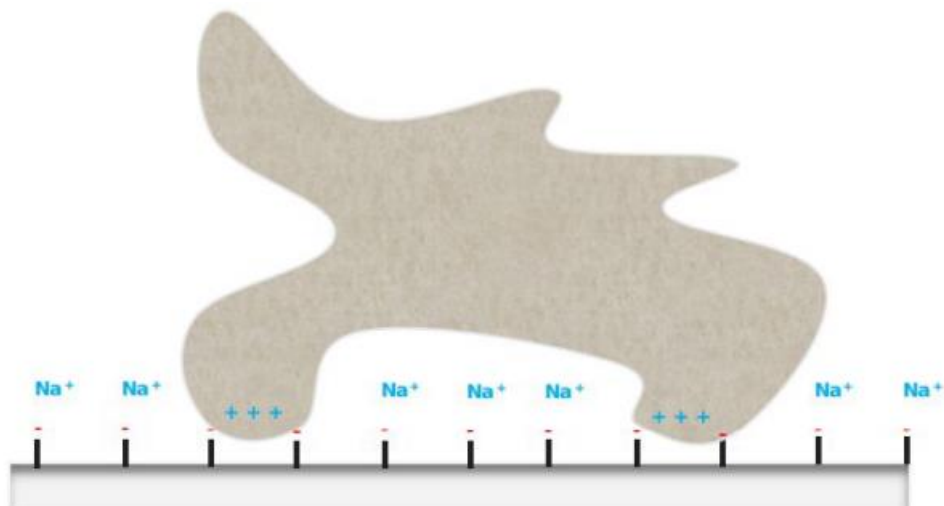
$$\frac{\partial q}{\partial t} = k_{Ads}cQ^v - k_{Des}qc_{sal}^v \quad (10)$$

O sistema estudado apresenta neutralidade eletrostática, significando que o número total de sítios ativos disponíveis na resina (\wedge) é preenchido ou pela proteína em questão ou pelos íons provenientes do sal no meio, sejam eles positivos ou negativos. Sendo assim, a Equação 11 expressa a condição de eletroneutralidade. A unidade de \wedge é mols/mL resina, ou seja, expressa o número de mols de sítios ativos disponíveis por volume de resina.

$$\wedge = Q + qv \quad (11)$$

No entanto, muitas proteínas possuem estruturas muito mais complexas se comparadas às dos íons presentes em solução. Por isso, quando suas regiões eletricamente carregadas se ligam aos sítios ativos é esperado que sua ampla estrutura tridimensional bloqueie e inviabilize a ocupação de outros sítios ativos disponíveis. A Figura 7 ilustra esquematicamente esta situação para uma superfície de troca catiônica. Neste caso, uma proteína eletricamente carregada se aproxima e se conecta a quatro sítios ativos. No entanto, outros três permanecem bloqueados por sua estrutura, inviabilizados de se ligarem a outras proteínas.

Figura 7 – Esquema representativo da ligação de proteínas em uma superfície de troca catiônica.



Fonte: Adaptado de Gallant (1995).

O fenômeno de bloqueio apresentado é teoricamente conhecido como fator

estérico (α) e pode ser representado matematicamente através de uma correção na Equação 11, conforme mostram as Equações 12 e 13.

$$\hat{Q} = Q + q(v + \alpha) \quad (12)$$

$$Q = \hat{Q} - q(v + \alpha) \quad (13)$$

As Equações 10 e 13 representam todos os fenômenos teóricos considerados pela IAEE. No entanto, elas devem ser adaptadas a um sistema com “i” proteínas, conforme se pode verificar nas Equações 14 e 15 (GALLANT *et al.*, 1995; CHEN *et al.*, 2017; GUIOCHON *et al.*, 2006; KARKOV *et al.*, 2013; HUUK *et al.*, 2014; GU, 2015; CARVALHO *et al.*, 2016).

$$\frac{\partial q_i}{\partial t} = k_{Ads} c_i Q^{v_i} - k_{Des} q_i c_{sal}^{v_i} \quad (14)$$

$$Q = \hat{Q} - \sum_{i=1}^N q_i (v_i + \alpha_i) \quad (15)$$

2.3. Crioprecipitação

A crioprecipitação se trata de um processo aplicado, geralmente, após as etapas de cromatografia, no qual uma amostra líquida do material obtido é submetida ao congelamento, tendo o objetivo de diminuir a solubilidade dos contaminantes proteicos e manter a proteína de interesse em solução após o descongelamento à temperatura ambiente. Para possibilitar a precipitação das moléculas contaminantes, a suspensão descongelada é centrifugada a uma temperatura de até 10°C para evitar a desnaturação da proteína-alvo (PESSOA; KILIKIAN, 2005).

O procedimento descrito pode ser influenciado pelo pH do meio, uma vez que quando este valor está próximo do ponto isoelétrico da proteína, a repulsão eletrostática entre as moléculas é mínima, favorecendo a precipitação por interação entre as zonas hidrófobas (PESSOA; KILIKIAN, 2005).

No presente trabalho, não é desejada a precipitação da PspA4Pro, que possui um ponto isoelétrico igual a 4,8. Portanto, foi adotado o procedimento desenvolvido no trabalho de Figueiredo (2014), realizando a crioprecipitação a pH 4,0, abaixo do pl da proteína de interesse, tornando positiva a carga global da proteína, promovendo a repulsão eletrostática e aumentando a proporção das interações iônicas com o meio.

No trabalho de Figueiredo *et al.* (2017), a PspA4Pro foi a proteína-alvo a ser purificada. A crioprecipitação a pH 4,0 foi feita congelando a -20°C a amostra obtida

após a etapa de cromatografia de troca aniônica, pelo período de 24 horas. Após o descongelamento, as impurezas foram separadas por centrifugação a 17696 g por 1 h e a 4°C. Foi verificado o aumento da pureza da PspA4Pro de 65,2% para 93,7%, sendo obtido um fator de purificação por etapa igual a 1,44 para a crioprecipitação.

Cardoso *et al.* (2022) também realizaram a purificação da PspA4Pro. De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, a crioprecipitação a pH 4,0 desenvolvida conforme o trabalho de Figueiredo *et al.* (2017) pode ser estudada como uma maneira de substituir etapas adicionais de cromatografia, o que pode ser considerado vantajoso devido ao fato de a crioprecipitação possuir menor custo se comparada às etapas de cromatografia, as quais possuem custo mais elevado em razão do alto valor das resinas utilizadas nas colunas cromatográficas.

No trabalho de Cardoso *et al.* (2022), a pureza da PspA4Pro de 78,3%, obtida após a cromatografia de troca aniônica, foi aumentada para 98,3% por meio da crioprecipitação a pH 4,0, sendo atingido um fator de purificação por etapa de 1,26. Dessa forma, como a pureza da proteína de interesse já se situou próxima do valor máximo, etapas subsequentes de cromatografia foram dispensadas.

A crioprecipitação é um procedimento pouco explorado na purificação de proteínas recombinantes, sendo mais utilizado para a obtenção de um constituinte mais purificado do plasma sanguíneo para transfusão (APELSETH *et al.*, 2022).

2.4. Purificação de proteínas sem *tag* (*untagged*)

O uso de *tag* consiste em uma modificação genética clássica na qual são introduzidas sequências adicionais de aminoácidos que conferem à proteína de interesse capacidade de se ligar a determinadas substâncias com o objetivo de facilitar o processo de purificação. A *tag* mais comum é a cauda contendo seis histidinas (His-*tag*), que quando adicionada à molécula-alvo, a torna suscetível à adsorção em zinco ou níquel presentes na resina de uma coluna de cromatografia. Trata-se de um procedimento baseado em afinidade química (PESSOA; KILIKIAN, 2005).

A estratégia de adição de *tag* à proteína de interesse pode ser útil uma vez que simplifica o processo de purificação, permitindo facilmente a detecção das moléculas e, algumas vezes, aumentando a estabilidade e a solubilidade da proteína. Entretanto,

o acréscimo de *tag* à molécula-alvo pode acarretar muitas desvantagens, afetando a estrutura conformacional, a atividade biológica e a toxicidade da proteína e, conseqüentemente, alterando a sua função (G-BIOSCIENCES, 2022).

Por causa desses efeitos negativos, idealmente, as ligações entre a *tag* e a proteína de interesse devem ser clivadas e uma etapa adicional deve ser adicionada ao processo de purificação para eliminar os resíduos das *tags*. Contudo, a remoção das *tags* possui dificuldades técnicas, a separação pode ter baixo rendimento e depende de resinas cromatográficas caras devido à similaridade entre as moléculas com *tag* e as hidrolisadas (ARNAU *et al.*, 2006).

Industrialmente, o acréscimo de *tag* à proteína só é útil quando apresenta vantagens terapêuticas ou na produção, pois demanda tempo adicional e custo adicionais associados às operações de purificação subsequentes que devem ser adicionadas quando a técnica é implementada ao processo, com o objetivo de remover a *tag* (BELL *et al.*, 2013).

Desta maneira, o desenvolvimento de um conjunto de etapas de purificação da molécula-alvo sem a adição de *tag* (*untagged*) se mostra uma alternativa interessante. Ademais, poucos estudos descrevem a purificação de proteínas recombinantes sem *tag*.

O trabalho de Figueiredo *et al.* (2017) descreve o processo de produção e purificação de um fragmento de PspA de clado 4 (PspA4Pro), contendo a fração N-terminal em α -hélice, o primeiro bloco do domínio rico em prolina e reações cruzadas com variantes de PspA dos clados de 1 a 5. O fragmento foi clonado sem o uso de *tag*, sendo produzido na fração intracelular solúvel de *Escherichia coli*. A estratégia de purificação foi elaborada para atingir, pelo menos, a pureza recomendada pela *World Health Organization* (WHO, 2009) para as proteínas transportadoras utilizadas em vacinas conjugadas do pneumococo com baixa quantidade de endotoxina.

O processo de purificação desenvolvido no trabalho mencionado empregou duas etapas de precipitação e duas operações de cromatografia. Os resultados obtidos incluíram a recuperação de 35% da PspA4Pro e uma pureza de 97,8%, além de ter sido uma metodologia mais barata comparada à purificação convencional utilizando a junção da His-*tag* à proteína, que usa a cromatografia por afinidade metálica, devido à eliminação dos custos das etapas requeridas para retirar a *tag*.

O trabalho de Benedini (2019) também foi desenvolvido tendo a PspA4Pro como a proteína de interesse, sem a adição de *tag*. A inovação apresentada neste

trabalho para a purificação da PspA4Pro se trata da modelagem e simulação feitas para a etapa de cromatografia de troca aniônica, a mais importante do processo. O procedimento mencionado permitiu estimar as condições ótimas para a execução da cromatografia, sendo possível a obtenção de purezas mais elevadas da proteína-alvo. A vantagem desta metodologia está relacionada à diminuição dos custos e do tempo necessário para a definição da melhor estratégia para o processo de purificação, uma vez que os trabalhos anteriores envolvendo purificação de proteínas sem *tag* eram baseados no método de tentativa e erro, que consistia, essencialmente, em selecionar várias etapas de cromatografia e organizá-las em diferentes sequências, verificando quais delas geravam os melhores resultados no desempenho da purificação.

Os resultados da simulação feita por Benedini (2019) foram comparados com os resultados de uma eluição experimental. Nos dois casos, foi observado que a PspA4Pro eluiu no início do pico, mostrando semelhança entre os perfis da simulação e do experimento e permitindo estabelecer um esquema de purificação alternativo que forneceu PspA4Pro a 82,8% de pureza, representando um aumento de 34% em relação ao processo de purificação original.

Benedini *et al.* (2020) desenvolveram um processo de produção e purificação de PspA4Pro sem a presença de *tag* incorporando a modelagem e simulação da etapa de cromatografia de troca aniônica para a estimativa das condições ótimas de operação da coluna cromatográfica, durante a realização das eluições.

A PspA4Pro foi produzida por meio de um cultivo de uma cepa de *Escherichia coli* BL21(DE3) abrigando o plasmídeo pET37b(+) contendo um fragmento do gene de PspA de *Streptococcus pneumoniae*, mesma plataforma de expressão empregada nos estudos de Figueiredo (2014). O procedimento foi feito em batelada num biorreator de 5 L a 29°C, utilizando meio definido e lactose como indutor. Após o cultivo, a biomassa foi separada do meio por centrifugação por 30 minutos a 4°C e 6700 g. Os pellets das células foram armazenados em bolsas plásticas a -80°C até o uso. Depois do descongelamento, as células foram submetidas a lise utilizando um homogeneizador de alta pressão. Posteriormente, 0,1% em massa por volume de CTAB foi adicionado ao material lisado e a amostra foi centrifugada por 90 minutos a 17696 g e 4°C, produzindo o clarificado (BENEDINI *et al.*, 2023).

Para a realização da modelagem e simulação da cromatografia de troca aniônica, foi necessário um conjunto de dados experimentais adequado, cobrindo uma ampla gama de condições operacionais. Dessa forma, o clarificado obtido

anteriormente foi processado em três cromatografias de troca aniônica sob diferentes protocolos de eluição, que foram baseados no uso de distintas forças iônicas para as eluições. As três cromatografias foram executadas numa coluna de Q-Sepharose acoplada a um cromatógrafo Äkta Avant 150. Todos os procedimentos de modelagem, estimativa de parâmetros e simulações foram realizados no Ambiente para Modelagem, Simulação e Otimização (EMSO) utilizando as equações do Modelo do Equilíbrio Dispersivo combinadas com as da Isoterma de Ação em Efeito Estérico (BENEDINI *et al.*, 2023).

A modelagem feita por Benedini *et al.* (2023) mostrou que o melhor protocolo de purificação foi baseado na redução das forças iônicas (120 e 250 mmol.L⁻¹ de NaCl), resultando em aumentos de 14,9% e 11,5% para a recuperação global e pureza de PspA4Pro, respectivamente, em comparação com o outro perfil de eluição (150 e 300 mmol.L⁻¹).

O trabalho de Cardoso *et al.* (2022) também foi baseado no processo de purificação da PspA4Pro, sem a presença de *tag*. Neste caso, o clarificado contendo a proteína-alvo foi obtido por meio de cultivos de uma cepa de *E. coli* BL21(DE3) ClearColi® pET37b+PspA4Pro, a mesma plataforma de expressão utilizada para a obtenção dos clarificados processados no presente trabalho. Os próximos parágrafos resumem a metodologia do trabalho de Cardoso *et al.* (2022).

O cultivo foi feito num biorreator de 5 L operando em batelada a temperatura de 32°C, utilizando meio definido. Para a indução, foram empregados IPTG 0,5 mmol.L⁻¹ e lactose 10 g.L⁻¹. O rendimento em PspA4Pro atingido no fim do cultivo foi igual a 145 mg PspA4Pro/g células (CARDOSO *et al.*, 2022).

Para a preparação do material para a purificação, a suspensão obtida no fim do cultivo foi centrifugada (30 min, a 4°C e 6700 g) e os pellets das células foram transferidos para bolsas plásticas e congelados a -80°C até uso. Subsequentemente, 100 g em base úmida dos pellets congelados foram ressuspensos em 1 L de uma solução tampão de lise de pH 6,5, composta por 10 mmol.L⁻¹ de fosfato de sódio, 2,5 mmol.L⁻¹ de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), 0,1% em massa por volume de Triton X-100 e 1 mmol.L⁻¹ de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF). A suspensão resultante foi rompida utilizando um homogeneizador de alta pressão. O clarificado obtido foi purificado por meio das etapas de cromatografia de troca aniônica e crioprecipitação (FIGUEIREDO *et al.*, 2017; BENEDINI *et al.*, 2020).

Conforme foi descrito em 2.3, a pureza máxima atingida no trabalho de Cardoso *et al.* (2022) foi igual a 98,3%. Dessa forma, foi compreendido que há a possibilidade de atingir valores elevados de pureza da proteína de interesse mesmo sem a adição de *tag*.

Além da PspA4Pro, outras proteínas recombinantes podem ser purificadas sem a presença de *tag*. Os próximos parágrafos irão apresentar trabalhos nos quais foram desenvolvidos processos de purificação de proteínas sem *tag* que foram obtidas por meio do cultivo em biorreator.

O trabalho de Li *et al.* (2024) teve como objetivo principal a produção de um anticorpo para regular a ação da linfopoietina estromal tímica (TSLP), uma citocina derivada de células epiteliais que desempenha um papel crucial na regulação das respostas imunes do tipo 2 em superfícies como a pele, o trato respiratório e o trato gastrointestinal em humanos.

A TSLP detém uma função importante no desenvolvimento e na persistência da inflamação das vias aéreas, podendo levar à liberação de citocinas do tipo 2 na região e provocando, conseqüentemente, sintomas da asma, uma doença respiratória crônica que pode ser influenciada por fatores genéticos, como o histórico familiar, e fatores ambientais, como a exposição à poeira, ácaros e fungos, variações climáticas e infecções virais. Atualmente, o Tezspire® da Amgen/Astrazeneca é o único medicamento aprovado globalmente na terapia direcionada à TSLP (LI *et al.*, 2024; CABERGS, 2024; AZMED, 2024).

O anticorpo produzido no trabalho de Li *et al.* (2024) se trata de um nanocorpo anti-TSLP, o qual pode se ligar especificamente à TSLP e bloquear sua interação com o receptor complexo, impedindo de forma eficiente que as células imunológicas visadas pela TSLP liberem citocinas proinflamatórias, promovendo, assim, o controle da asma. De acordo com Liu *et al.* (2018), a massa molecular deste nanocorpo varia de 12 a 15 kDa. O ponto isoelétrico do nanocorpo produzido no trabalho se situa entre 5,0 e 6,0 (LI *et al.*, 2024).

Para a produção da proteína de interesse, foi feito o cultivo de uma cepa de *Pichia pastoris* em meio complexo num biorreator de 7 L operando no modo batelada alimentada a 30°C e pH 6,0, com volume inicial de meio de 2 L. A indução foi feita com metanol numa concentração de 100% em volume. Li *et al.* (2024) também avaliaram a ampliação de escala do cultivo, aumentando o volume do biorreator de 7

para 100 L, de acordo com o princípio da similaridade geométrica para manter uma relação altura-diâmetro consistente. Os parâmetros principais do processo não sofreram mudanças, tendo apenas o volume inicial de meio alterado para 33 L. A concentração de anti-TSLP obtida no cultivo em menor escala foi igual a 23,38 g/L, enquanto a atingida no cultivo em maior escala foi igual a 22,97 g/L.

Foram feitas três purificações do nanocorpo anti-TSLP por meio de duas etapas de cromatografia, tanto para o processo desenvolvido em escala menor quanto para o realizado em escala ampliada. A primeira etapa foi a cromatografia de modo misto feita com uma resina Diamond Mix-A, a qual possibilita interações hidrofóbicas e, também, de troca aniônica. Neste primeiro caso, a coluna cromatográfica utilizada foi equilibrada a um pH de 7,0. A segunda operação foi a cromatografia de modo misto realizada com uma resina Diamond MMC, que favorece interações hidrofóbicas e, também, de troca catiônica. Nesta segunda situação, a coluna cromatográfica foi equilibrada a um pH de 4,3 (LI *et al.*, 2024).

Para o processo feito em escala menor, a pureza mais elevada encontrada na cromatografia com Diamond Mix-A foi igual a 97,3%, com um rendimento global de 71,8%, que representa a fração entre a massa eluída da proteína de interesse e a massa de entrada da proteína na coluna. A pureza mais alta atingida na cromatografia com Diamond MMC foi de 99,1%, com um rendimento global de 69,5% (LI *et al.*, 2024).

Para o processo em escala ampliada, a maior pureza atingida na cromatografia com Diamond Mix-A foi de 97,1%, tendo um rendimento global de 71,4%. A pureza mais alta alcançada na cromatografia com Diamond MMC foi de 98,8%, com um rendimento global de 70,0% (LI *et al.*, 2024).

O próximo trabalho apresentado sobre a produção e purificação de uma proteína recombinante sem *tag* foi escrito por Eguia *et al.* (2021). A molécula-alvo se tratou de uma variante do fator estimulador de colônias granulocitárias (G-CSF), que se trata de uma citocina hematopoiética a qual possui importantes aplicações clínicas no tratamento da neutropenia, podendo também ser usada na prevenção de complicações médicas sofridas por pacientes com câncer e AIDS. A Nartograstin de G-CSF (rhG-CSF) apresenta maior estabilidade e atividade biológica se comparada à proteína original devido às mutações, favorecendo a administração de doses mais baixas em pacientes (TANAKA *et al.*, 1997). A massa molecular da proteína de interesse é igual a 18,8 kDa e seu ponto isoelétrico está próximo de 6,1 (EGUIA *et*

al., 2021; CHI *et al.*, 2003).

Para a produção da proteína-alvo, Eguia *et al.* (2021) realizaram três cultivos de uma cepa de *Escherichia coli* recombinante. Os dois primeiros cultivos foram feitos no modo batelada e em meio complexo, enquanto o terceiro cultivo foi feito em batelada alimentada e utilizando meio definido. Em todos os cultivos, foi utilizado um biorreator de 10 L com 7 L de volume de meio, operando a 30°C e pH 6,8. Nos cultivos em meio complexo, a indução ocorreu quando a glicose foi esgotada e a lactose passou a ser utilizada como fonte de carbono, induzindo a síntese de rhG-CSF. Já no cultivo em meio definido, a indução foi feita por meio da adição de 0,5 mmol.L⁻¹ de IPTG e 20 g/L de lactose à cultura, no momento em que a biomassa atingiu a densidade ótica de 130 num comprimento de onda de 600 nm, correspondendo a uma concentração de, aproximadamente, 50 g/L. Em ambos os cultivos feitos no modo batelada, o rendimento em rhG-CSF foi próximo de 28 mg rhG-CSF/g células úmidas no fim do processo. No fim do cultivo realizado em batelada alimentada, foi obtido um rendimento em rhG-CSF igual a 4 mg rhG-CSF/g células úmidas.

Num primeiro momento, os autores decidiram realizar a purificação da rhG-CSF por meio de uma única etapa cromatográfica, que foi a cromatografia de troca catiônica utilizando uma coluna de SP-Sepharose equilibrada a pH 5,0. Foi feita a purificação da biomassa obtida em meio complexo e da biomassa resultante do cultivo em meio definido. Em ambos os casos, a pureza final atingida foi próxima de 80%, contudo, o rendimento global em massa da proteína de interesse foi inferior a 0,5% nos dois casos (EGUIA *et al.*, 2021).

Em razão da pureza ter sido inferior a 90% com o uso da metodologia anterior, Eguia *et al.* (2021) decidiram acrescentar mais uma operação cromatográfica à purificação da rhG-CSF, que foi a cromatografia de troca aniônica usando uma coluna de Q-Sepharose equilibrada a pH 8,0. A etapa mencionada foi executada antes da cromatografia de troca catiônica com SP-Sepharose. Neste segundo procedimento de purificação, foi empregada a biomassa obtida em meio definido. Foi atingida a pureza de 87,3% e o rendimento global de 36,3% após a cromatografia com Q-Sepharose e, sucessivamente, foi obtida a pureza de 91,8% e o rendimento global de 2,2% depois da execução da cromatografia com SP-Sepharose. O baixo rendimento se deve à produção em corpo de inclusão, por conta da renaturação.

O próximo trabalho que relata a obtenção e purificação de uma proteína recombinante sem *tag* foi elaborado por Li *et al.* (2022). A molécula-alvo se tratou de

um nanocorpo utilizado na regulação da atividade do fator de crescimento nervoso (NGF), responsável pelo crescimento e desenvolvimento de neurônios periféricos e centrais, mantendo a sobrevivência neuronal e desempenhando um papel fundamental na artrite e nas dores crônica e aguda. Nesse sentido, o nanocorpo produzido no trabalho (anti-NGF) possui propriedades terapêuticas para o alívio dos sintomas mencionados. A massa molecular da proteína-alvo é de 42 kDa e seu ponto isoelétrico é igual a 6,5 (LI *et al.*, 2022).

Para a obtenção da proteína de interesse, foi feito o cultivo em meio definido de uma cepa de *Pichia pastoris* num biorreator de 7 L a 29°C por 7 dias. Posteriormente, a biomassa obtida foi centrifugada a 8000 g por 15 minutos e o sobrenadante foi coletado e filtrado usando membranas de 0,45 e 0,22 µm sobrepostas. O material resultante apresentou pH 5,5, condutividade de 20 mS/cm e concentração de 2,3 mg/mL (LI *et al.*, 2022).

Já para a purificação de anti-NGF, as etapas mais importantes se trataram de duas operações de cromatografia. A primeira fase foi feita com o objetivo de capturar a molécula-alvo e se tratou da cromatografia de modo misto utilizando as resinas Capto MMC e Eshmuno HCX empacotadas numa coluna equilibrada a pH 5,0, que foi conectada a um cromatógrafo Äkta Avant 25. As resinas citadas possibilitaram interações hidrofóbicas e, também, de troca catiônica. A segunda etapa se tratou de uma cromatografia de troca catiônica usando uma coluna de Capto S ImpAct equilibrada a pH 5,0, cuja finalidade foi remover as impurezas proteicas do material e possibilitar, dessa maneira, a obtenção de uma pureza mais elevada para a proteína-alvo (LI *et al.*, 2022).

A pureza encontrada após a primeira cromatografia foi de 93%, tendo sido obtido um rendimento global de 76,9% em relação à massa de anti-NGF presente no sobrenadante obtido ao fim do cultivo. Depois da segunda cromatografia, a pureza atingida foi de 99,8%, com um rendimento global de 64,6%.

De acordo com os trabalhos da literatura revisados sobre purificação de proteínas sem *tag*, é possível atingir purezas acima de 90% das proteínas de interesse. Os trabalhos de Benedini (2019) e Benedini *et al.* (2020) utilizaram a modelagem e a simulação da etapa de cromatografia para a estimativa das condições ótimas de operação da coluna, indicando que a metodologia citada pode ser explorada em trabalhos futuros cujo objetivo seja realizar a purificação de uma proteína sem *tag*, como foi o caso do presente trabalho. Dessa forma, torna-se

possível reduzir os custos e o tempo necessário para a seleção e a disposição adequada das etapas de cromatografia.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Produção da proteína de interesse

A obtenção da proteína de superfície de pneumococo A (PspA) para os estudos de purificação foi realizada por meio de cultivos da cepa comercial ClearColi[®] recombinante, que apresentava um fragmento do gene de PspA de *Streptococcus pneumoniae*. O domínio N-terminal e o primeiro bloco rico em prolina do gene PspA (GenBank: EF649969.1), aqui denominado PspA4Pro, foi inserido no plasmídeo pET37b + (Novagen) e expresso em *E. coli* BL21(DE3) ClearColi[®] (LGC Biosearch Technologies, Middlesex, Reino Unido) (PAREDES, 2018; CARDOSO, 2019).

Os cultivos foram conduzidos num biorreator de 5 L, com volume de meio de 3,5 L, operado no modo batelada, durante o doutorado de Valdemir Moretto Cardoso (CARDOSO, 2019) realizado nos laboratórios do Departamento de Engenharia Química (UFSCar), empregando as condições de cultivo resumidas na Tabela 1.

Tabela 1 – Cultivos realizados para produção e purificação de PspA4Pro (CARDOSO, 2019).

Cultivo	Condições do cultivo	Processo de purificação
1	Meio complexo. Indução com IPTG a 1,0 mmol.L ⁻¹ a 32°C.	P3
2	Meio complexo. Indução com IPTG a 0,7 mmol.L ⁻¹ a 32°C.	P1 e P6
3	Meio definido. Indução com IPTG a 0,7 mmol.L ⁻¹ a 32°C.	P2, P4 e P5

Para efeito de comparação de desempenho dos processos de purificação, foram selecionadas biomassas obtidas em meio complexo (cultivos 1 e 2) e em meio definido (cultivo 3). Em todos os cultivos, a indução foi realizada com isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) e a temperatura foi mantida em 32°C.

Para a preparação do material para a purificação, as suspensões obtidas ao final dos cultivos foram centrifugadas (30 min, a 4°C e 6700 g), os pellets das células foram transferidos para bolsas plásticas, congelados a -80°C e enviados ao Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas do Instituto Butantan, onde permaneceram armazenados a -80°C em ultrafreezer até uso.

3.2. Estudos de purificação

A partir das biomassas obtidas nos cultivos 1 a 3, foram realizados seis estudos de purificação de PspA4Pro, P1 a P6, conforme descrito na Tabela 1. O procedimento experimental adotado nos seis processos de purificação envolveu as etapas de rompimento celular, precipitação com detergente de CTAB, cromatografia de troca aniônica e crioprecipitação, as quais são detalhadas nos próximos tópicos. Todos os experimentos de purificação foram realizados no Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas do Instituto Butantan.

Em razão do presente trabalho ter utilizado a mesma plataforma de expressão do trabalho de Cardoso *et al.* (2022) para a produção da PspA4Pro e ter, também, utilizado uma metodologia similar para a purificação da proteína-alvo, foi feito o estudo dos resultados das purificações feitas no presente trabalho para a realização de possíveis comparações com os dados do trabalho de Cardoso *et al.* (2022).

As duas primeiras purificações, P1 e P2, foram feitas utilizando as biomassas que foram escolhidas com base nos altos valores de rendimento em PspA4Pro obtidos no fim dos cultivos. O dado foi igual a 175 mg PspA4Pro/g células para a biomassa usada na P1 e equivalente a 152 mg PspA4Pro/g células para a biomassa empregada na P2 (CARDOSO, 2019).

Além disso, a seleção das duas biomassas também foi motivada pela diferença no meio de cultivo utilizado para a obtenção de cada uma (meio complexo, cultivo 2 na P1 e meio definido, cultivo 3 na P2), tornando possível, posteriormente, o estudo

da influência do uso de meios de cultivo diferentes no desempenho do processo de purificação (Tabela 1). Nas duas purificações, a estratégia de execução da etapa de cromatografia de troca aniônica foi a mesma, tendo sido adotado o protocolo de eluição proposto no trabalho de Benedini (2019), utilizando o gradiente de concentração de NaCl nos valores de 100, 250 e 1000 mmol.L⁻¹, sempre com 5 volumes de coluna para cada eluição.

Contudo, as purificações 1 e 2 apresentaram falhas devido à elevação da temperatura observada durante o rompimento celular, comprometendo a avaliação da influência do meio de cultivo no desempenho das purificações. Dessa forma, foi decidido executar a purificação 3 (P3) utilizando a biomassa do cultivo 1, obtida em meio complexo, comparando os resultados obtidos com os da purificação de Cardoso *et al.* (2022), cuja biomassa foi obtida em meio definido.

A estratégia de execução da etapa de cromatografia de troca aniônica na P3 foi a mesma do trabalho de Cardoso *et al.* (2022), sendo correspondente ao uso do protocolo de eluição proposto no trabalho de Figueiredo *et al.* (2014), com o gradiente de concentração de NaCl nos valores de 150, 300 e 1000 mmol.L⁻¹, sempre com 5 volumes de coluna para cada eluição. O rendimento em PspA4Pro atingido no cultivo da biomassa usada na P3 foi igual a 100 mg PspA4Pro/g células (CARDOSO, 2019).

De posse da informação a respeito da influência do meio de cultivo nos resultados das purificações, também foi desejado realizar a comparação entre os protocolos de eluição de Benedini (2019) e Figueiredo (2014), verificando a eficiência de cada um no processo de purificação.

Para isso, os resultados da purificação de Cardoso *et al.* (2022) deveriam ser comparados com os dados da purificação de uma biomassa obtida em meio definido e utilizando o protocolo de Benedini (2019). Uma vez que a P2 não poderia ser utilizada nesse estudo devido ao prejuízo causado pelo aumento da temperatura durante a lise celular, foi decidido executar a purificação 4 (P4) como uma réplica da P2, corrigindo o problema mencionado.

Apesar das biomassas utilizadas na P4 e na purificação de Cardoso *et al.* (2022) terem sido ambas obtidas em meio definido, elas apresentavam diferenças na produção de proteína, como o uso de IPTG a 0,5 mmol.L⁻¹ juntamente com lactose a 10 g.L⁻¹ para a indução por Cardoso *et al.* (2022), ao passo que para a indução da biomassa no cultivo 3 foi empregado apenas o IPTG a 0,7 mmol.L⁻¹ (Tabela 1). Além

disso, o homogeneizador de alta pressão empregado por Cardoso *et al.* (2022) foi distinto se comparado ao da P4 e, também, houve diferença na metodologia de quantificação de proteínas solúveis totais, tendo sido utilizado o método de Lowry no trabalho de Cardoso *et al.* (2022) e o método do ácido bicinconínico (BCA) na P4.

Tendo em vista todas as diferenças apresentadas entre a P4 e a purificação de Cardoso *et al.* (2022), foi decidida a execução da purificação 5 (P5) utilizando a mesma biomassa da P4 e adotando o protocolo de Figueiredo (2014), com o objetivo de possibilitar uma comparação mais adequada entre os protocolos de Benedini (2019) e de Figueiredo (2014). Neste caso, com exceção do protocolo de eluição, foi empregada a mesma metodologia de purificação na P4 e na P5 e, também, foi utilizado o método BCA para a quantificação de proteínas solúveis totais.

Analisando os resultados das purificações realizadas com o protocolo de Benedini (2019), foi percebido que em nenhuma delas tinha sido atingido o valor mínimo desejado de pureza para a proteína de interesse, igual a 95%. Em razão da P1 ter sido prejudicada em decorrência do aumento de temperatura observado no rompimento celular, foi decidido executar a purificação 6 (P6) utilizando a mesma biomassa da P1, pois no cultivo dela havia sido atingido o maior rendimento em PspA4Pro, de 175 mg PspA4Pro/g células (CARDOSO, 2019), havendo maior possibilidade de atingir a pureza pretendida da proteína de interesse com o uso da biomassa citada. O protocolo de eluição selecionado na P6 foi o de Benedini (2019), o mesmo da P1.

A execução da P6 foi motivada, principalmente, pelo objetivo de alcançar a pureza mínima de 95% para a PspA4Pro com a adoção do protocolo de Benedini (2019) para a cromatografia de troca aniônica. Contudo, a reprodução desta purificação também possibilitou um estudo adicional sobre a influência do uso de meios de cultivo e protocolos de eluição diferentes no desempenho do processo. Isto ocorreu porque os resultados da P6, feita em meio complexo, puderam ser comparados com os da P4, feita em meio definido, tendo ambas as purificações sido executadas usando o protocolo de Benedini (2019). Além disso, os dados da P6, realizada com o protocolo de Benedini (2019), puderam ser comparados com os da P3, realizada com o protocolo de Figueiredo (2014), tendo ambas as biomassas sido obtidas em meio complexo. A Tabela 2 resume os dados mais importantes sobre as purificações realizadas e as motivações de cada uma.

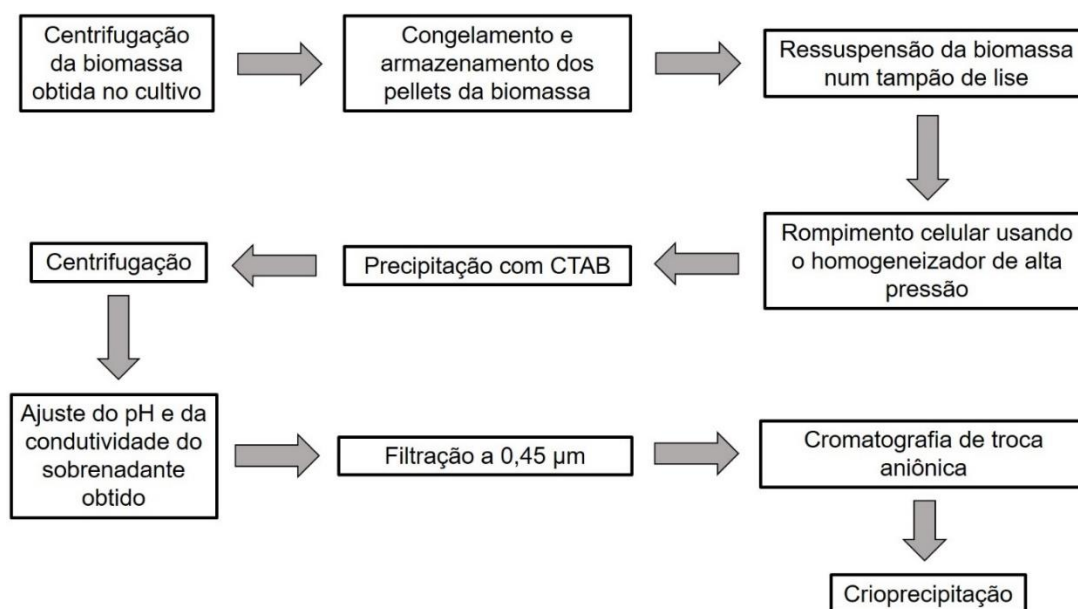
Tabela 2 – Principais informações sobre as purificações realizadas.

Purificação	Condições do cultivo	Protocolo de eluição	Justificativas
1	Meio complexo. Indução com IPTG a 0,7 mmol.L ⁻¹ a 32°C.	Benedini (2019)	Alto rendimento em PspA4Pro.
2	Meio definido. Indução com IPTG a 0,7 mmol.L ⁻¹ a 32°C.	Benedini (2019)	Alto rendimento em PspA4Pro. Comparação com a P1 (meios de cultivos diferentes).
3	Meio complexo. Indução com IPTG a 1,0 mmol.L ⁻¹ a 32°C.	Figueiredo (2014)	Comparação com a purificação de Cardoso <i>et al.</i> (2022) (meios de cultivo diferentes).
4	Meio definido. Indução com IPTG a 0,7 mmol.L ⁻¹ a 32°C.	Benedini (2019)	Repetição da P2.
5	Meio definido. Indução com IPTG a 0,7 mmol.L ⁻¹ a 32°C.	Figueiredo (2014)	Comparação com a P4 (protocolos de eluição diferentes).
6	Meio complexo. Indução com IPTG a 0,7 mmol.L ⁻¹ a 32°C.	Benedini (2019)	Repetição da P1. Comparação com a P3 (protocolos de eluição diferentes). Comparação com a P4 (meios de cultivo diferentes).

3.2.1. Descrição geral do procedimento experimental

A Figura 8 apresenta o diagrama de blocos descrevendo de maneira simplificada todas as etapas necessárias para a obtenção da proteína de interesse com um alto valor de pureza, que foram executadas nos estudos de purificação de PspA4Pro desenvolvidos no presente trabalho, desde a centrifugação da biomassa obtida em cada cultivo feito no trabalho de Cardoso (2019), conforme descrito no tópico 3.1, até a operação final de crioprecipitação.

Figura 8 – Diagrama de blocos do procedimento experimental adotado em nas purificações.



Fonte: Autor.

3.2.1.1. Rompimento celular (RC)

Os pellets congelados de cada um dos cultivos apresentados na Tabela 1 foram ressuspensos num tampão de lise, composto por fosfato de sódio 100 mmol.L⁻¹ a pH de 6,5, Triton X-100 a 0,1% em massa por volume e EDTA 5 mmol.L⁻¹ (FIGUEIREDO *et al.*, 2017). Foram adicionados 300 mL da solução tampão de lise para 30 g dos pellets de cada biomassa. No momento da ressuspensão com o agitador, foi adicionado, também, o inibidor de proteases fluoreto de fenilmetilsulfonil

(PMSF) 1 mmol.L^{-1} , num volume de 3 mL (FIGUEIREDO *et al.*, 2017). As suspensões foram agitadas por 15 minutos, armazenadas em recipientes e então processadas no homogeneizador de alta pressão Panda Plus, equipamento empregado no rompimento celular, mostrado na Figura 9.

Figura 9 – Panda Plus, sistema utilizado para ruptura celular.



Fonte: Autor.

O homogeneizador Panda Plus não possui conexão a um banho de refrigeração e, dessa maneira, foi verificada a necessidade de manter a temperatura abaixo de 35°C ao longo do desenvolvimento do trabalho. Na Tabela 3, estão identificadas as biomassas obtidas em cada cultivo e seu respectivo RC, juntamente com a descrição de quando houve ou não o controle de temperatura em cada caso.

No caso da P1 e da P2, a pressão de operação selecionada foi de 500 bar e a vazão de recirculação medida nesta condição foi $0,265 \text{ L/min}$. As amostras foram recirculadas em *loop* fechado até todo o volume de 300 mL passar 9 vezes pelo homogeneizador, resultando num tempo de processo de 8 minutos. Foi medido o volume de cada amostra após o rompimento celular utilizando provetas de 500 mL.

A partir da P3, a pressão de operação escolhida foi de 1200 bar. A cada passagem dos conteúdos pelo homogeneizador, os volumes foram inseridos em recipientes e resfriados no gelo. Ao todo, foram realizadas quatro passagens das

amostras pelo equipamento. Este procedimento foi adotado em razão de P1 e P2 terem apresentado um aumento da temperatura, podendo causar a desnaturação da proteína de interesse. Posteriormente à lise celular, foi medido o volume de cada material com o uso de provetas de 500 mL.

Tabela 3 – Descrição da etapa de rompimento celular executada para cada biomassa.

Cultivo	Condições do cultivo	Identificação do rompimento celular	Ocorrência do controle de temperatura
1	Meio complexo. Indução com IPTG a 1,0 mmol.L ⁻¹ a 32°C.	RC3	Sim
2	Meio complexo. Indução com IPTG a 0,7 mmol.L ⁻¹ a 32°C.	RC1 e RC6	Somente na RC6
3	Meio definido. Indução com IPTG a 0,7 mmol.L ⁻¹ a 32°C.	RC2, RC4 e RC5	Somente na RC4 e na RC5

3.2.1.2. Precipitação com CTAB

Foi adicionado 0,1% em massa por volume de CTAB às suspensões obtidas depois do rompimento celular (FIGUEIREDO *et al.*, 2017). Os próximos passos foram a agitação e a centrifugação dos materiais, cujo objetivo foi precipitar os contaminantes proteicos.

No caso das purificações 1, 3, 4, 5 e 6 os conteúdos foram agitados por 1 hora e, posteriormente, centrifugados a 10000 rpm por 1 hora a 10°C (FIGUEIREDO *et al.*, 2017). Já com relação à P2, a agitação foi feita no tempo de 1 hora e 30 minutos e foram feitas duas centrifugações a 10000 rpm com duração de 1 hora cada, pelo fato de não ter ocorrido precipitação integral de contaminantes com uma única centrifugação. Os sobrenadantes obtidos após as centrifugações foram transferidos

para béqueres e homogeneizados, tendo sido denominados como os clarificados de cada purificação. Foram retiradas duas alíquotas de 2 mL de cada um dos clarificados, as quais foram transferidas para tubos eppendorf para posterior análise da concentração de proteínas solúveis totais e da pureza da PspA4Pro.

3.2.1.3. Cromatografia de troca aniônica (CTA) em Q-Sepharose

A cromatografia de troca aniônica é a etapa mais importante da purificação da PspA4Pro, na qual se define uma estratégia de eluição para obter uma fração mais rica na proteína de interesse, enquanto as outras frações contêm, principalmente, as proteínas contaminantes.

O primeiro método de eluição estudado no presente trabalho se trata do protocolo desenvolvido por Benedini (2019). Conforme mencionado em 3.2, o gradiente crescente de eluição para este método foi composto pelas concentrações de 100, 250 e 1000 mmol.L⁻¹ de NaCl, utilizando 5 volumes de coluna para cada eluição. A eluição central se trata daquela na qual foi utilizada a concentração de NaCl intermediária dentre as três eluições.

O protocolo de Benedini (2019) foi escolhido para a execução das primeiras purificações (P1 e P2) pelo fato de a modelagem e simulação da etapa de cromatografia de troca aniônica feitas no trabalho citado terem constatado a formação de um pico mais amplo para a proteína de interesse no perfil de eluição quando a concentração de NaCl na eluição central foi igualada a 250 mmol.L⁻¹, ao passo que os picos referentes à PspA4Pro foram mais estreitos quando as concentrações de NaCl na eluição central foram iguais a 300 e 350 mmol.L⁻¹.

Com base na observação anterior, são esperados melhores resultados de pureza da PspA4Pro quando a concentração de NaCl na eluição central for igual a 250 mmol.L⁻¹. Porém, no caso de Benedini (2019), a PspA4Pro purificada foi obtida a partir de cultivos de *E. coli* BL21(DE3) pET37b+PspA4Pro como plataforma de expressão, enquanto os clarificados processados no presente trabalho foram obtidos em cultivos de *E. coli* BL21(DE3) ClearColi® pET37b+PspA4Pro.

O segundo método de eluição utilizado no presente trabalho se trata do protocolo de eluição elaborado por Figueiredo (2014). De acordo com o que foi citado

em 3.2, o gradiente crescente de eluição para este método foi composto pelas concentrações de 150, 300 e 1000 mmol.L⁻¹ de NaCl, utilizando 5 volumes de coluna para cada eluição.

O trabalho de Figueiredo (2014) apresentou resultados elevados da pureza de PspA4Pro na eluição com a concentração de NaCl igual a 300 mmol.L⁻¹. O protocolo deste trabalho foi adotado na P3 unicamente em razão dessa purificação ter utilizado uma biomassa obtida em meio complexo, possibilitando a comparação do desempenho no processo com o do trabalho de Cardoso *et al.* (2022), que utilizou o mesmo protocolo para a purificação usando, porém, uma biomassa obtida em meio definido.

Conforme a simulação feita no trabalho de Benedini (2019) indicou, são esperadas purezas mais altas da PspA4Pro se a concentração de NaCl na eluição central do protocolo de Figueiredo (2014), 300 mmol.L⁻¹, for substituída por 250 mmol.L⁻¹.

Portanto, a P4 foi realizada com o objetivo de possibilitar o estudo dessa afirmação, utilizando uma biomassa obtida em meio definido e o protocolo de Benedini (2019) para comparar o resultado obtido com o do trabalho de Cardoso *et al.* (2022), que utilizou uma biomassa obtida também em meio definido para a purificação adotando, porém, o protocolo de eluição de Figueiredo (2014). Ainda neste raciocínio, a P5 foi executada usando a mesma biomassa da P4 e empregando o protocolo de eluição de Figueiredo (2014), possibilitando mais uma comparação entre os protocolos de eluição de Benedini (2019) e de Figueiredo (2014).

Com a realização da P6, foi possível fazer uma terceira comparação entre os dois protocolos de eluição usados no trabalho, em razão da P6 ter sido feita em meio complexo usando o protocolo de Benedini (2019), podendo ser comparada com a P3, feita também em meio complexo, porém, utilizando o protocolo de Figueiredo (2014).

Em todas as cromatografias, foi realizado o fracionamento da eluição central (250 mmol.L⁻¹ para P1, P2, P4 e P6 e 300 mmol.L⁻¹ para P3 e P5) em dez subfrações de volumes idênticos, que foram coletadas separadamente, com o objetivo de identificar possíveis amostras apresentando maior pureza da proteína de interesse (BENEDINI, 2019).

A Tabela 4 indica todos os detalhes de cada cromatografia de troca aniônica realizada no presente trabalho. As frações de saída da coluna cromatográfica incluem

a fração não adsorvida (QNAds) e as frações e subfrações de eluição, que são identificadas por “Q(valor da concentração de NaCl em mmol.L⁻¹)_número da subfração, se for da eluição central” (BENEDINI *et al.*, 2020).

As seis cromatografias de troca aniônica foram realizadas em resina Q-Sepharose acoplada a um cromatógrafo Äkta Avant 150, mostrado na Figura 10. O volume de coluna foi de 74 mL e a vazão de trabalho, 13,5 mL/min. Antes de cada uso da coluna cromatográfica, foi feita a sua lavagem com água Milli-Q utilizando um volume igual a 5 volumes de coluna (FIGUEIREDO *et al.*, 2017).

Foi elaborada uma solução mãe de fosfato de sódio 100 mmol.L⁻¹ a um pH de 6,5, o qual foi empregado para a obtenção das soluções tampão de equilíbrio e de eluição. O tampão concentrado foi filtrado em membrana de porosidade 0,45 µm. Em seguida, foi preparado o tampão de equilíbrio da Q-Sepharose composto por fosfato de sódio 10 mmol.L⁻¹ a um pH de 6,5. Foi medida a temperatura e a condutividade do tampão com o uso de um condutivímetro. A solução foi filtrada a 0,45 µm e adicionada à coluna até que o pH do sistema atingisse o valor de 6,5 (FIGUEIREDO *et al.*, 2017).

Preparou-se, também, o tampão de eluição da coluna a 1 mol.L⁻¹ de NaCl dissolvendo 58,5 g do sal sólido em 1 L de fosfato de sódio 10 mmol.L⁻¹ a um pH de 6,5. O tampão foi filtrado a 0,45 µm. Por último, foi feita a solução de limpeza da coluna composta por 1 mol.L⁻¹ de NaCl e 0,6% em volume de ácido acético glacial em água Milli-Q. A solução foi filtrada a 0,45 µm e utilizada para a limpeza da coluna posteriormente a cada cromatografia (FIGUEIREDO *et al.*, 2017).

Figura 10 – Cromatógrafo Äkta Avant 150.



Fonte: Figueiredo (2014).

Antes de processar os clarificados de cada purificação na coluna cromatográfica, o pH e a condutividade deles foram ajustados de modo a tornar os valores iguais aos da solução tampão de equilíbrio. Para o ajuste do pH, foram utilizadas soluções de ácido clorídrico e hidróxido de sódio. Para o acerto da condutividade, foi adicionada água Milli-Q a cada um dos clarificados. Os materiais foram filtrados a 0,45 μm e os volumes medidos com o uso de provetas, tendo sido esses valores os considerados como os volumes de clarificado de cada uma das seis purificações (FIGUEIREDO *et al.*, 2017).

Tabela 4 – Informações sobre a CTA feita em cada uma das purificações.

Processo no qual a CTA foi realizada	Condições de cultivo para a obtenção da biomassa	Rendimento em PspA4Pro (mg PspA4Pro/g células)	Protocolo de eluição	Frações de saída
P1 e P6	Meio complexo. Indução com IPTG a 0,7 mmol.L ⁻¹ a 32°C.	175	Benedini (2019)	QNAds, Q100, Q250_1 a Q250_10 e Q1000
P2 e P4	Meio definido. Indução com IPTG a 0,7 mmol.L ⁻¹ a 32°C.	152		
P3	Meio complexo. Indução com IPTG a 1,0 mmol.L ⁻¹ a 32°C.	100	Figueiredo (2014)	QNAds, Q150, Q300_1 a Q300_10 e Q1000
P5	Meio definido. Indução com IPTG a 0,7 mmol.L ⁻¹ a 32°C.	152		

Após cada uso e limpeza da coluna cromatográfica com a solução preparada previamente, foram inseridos nela 5 volumes de coluna de água Milli-Q e, consecutivamente, 3 volumes de coluna de solução de etanol em água Milli-Q com concentração de 20% em volume. Este procedimento foi feito para condicionamento da coluna para armazenamento (FIGUEIREDO, 2014).

Todas as amostras de saída da coluna foram homogeneizadas, retirando-se duas alíquotas de 2 mL de cada uma delas e colocando-as em tubos eppendorf. Foi também medido o volume da fração não adsorvida e da solução ácida utilizando provetas.

No caso particular da fração Q1000, a alta concentração de sal poderia prejudicar as análises das etapas posteriores. Dessa forma, foi executada a diálise de todas as frações Q1000 das purificações para aumentar a concentração proteica e diminuir a concentração do sal.

O procedimento de diálise consistiu em inserir 500 μ L da alíquota da Q1000 num tubo com um filtro para centrifugação da Amicon[®], centrifugando o conteúdo por 30 minutos até o volume atingir 50 μ L. Sucessivamente, o valor foi completado com água destilada até 500 μ L, sendo feita novamente a centrifugação nas mesmas condições. Por último, o filtro foi invertido num novo frasco, rotacionando-o por 2 minutos. O material contido no fundo do tubo foi utilizado para realizar as análises da fração Q1000 (MERCK MILLIPORE, 2024).

3.2.1.4. Fracionamento da eluição central e caracterização

Nos próximos parágrafos, serão apresentados os resultados do trabalho de Benedini (2019) referentes ao fracionamento da eluição central de uma cromatografia de troca aniônica e de que maneira a adoção de um método similar ao do trabalho mencionado pode influenciar no desempenho das purificações.

No trabalho de Benedini (2019), foi feita a simulação da eluição Q300 de uma cromatografia de troca aniônica que, depois, foi aplicada num procedimento experimental. No caso, o pico Q300 foi fracionado em seis subfrações, cada uma com 0,5 volume de coluna, sendo feita a medida da pureza e da massa total de proteínas de cada subfração na simulação do extrato celular clarificado virtual e, também, na

etapa experimental. Os resultados de pureza e de massa total de proteínas das subfrações foram comparados nos dois casos citados, com o objetivo de verificar se os dados experimentais obtidos podiam ser representados pelo modelo utilizado na simulação. Os resultados demonstraram claramente a precisão do modelo usado e a adequação da metodologia de modelagem para a determinação numérica dos parâmetros. De acordo com a simulação, a segunda subfração da eluição central apresentou 35,2% da massa de proteínas totais eluída, com pureza 25,1% maior que a obtida para a fração Q300 de outra cromatografia de troca aniônica executada no trabalho, na qual não havia sido feito o fracionamento. Um comportamento semelhante foi observado nos dados experimentais para essa mesma subfração, que apresentou 39,9% da massa de proteínas totais eluída, com pureza 34,0% superior à da fração Q300 da cromatografia de troca aniônica na qual não tinha sido feito o fracionamento.

De acordo com os resultados atingidos no trabalho de Benedini (2019), tornou-se interessante implementar o fracionamento da eluição central nas seis purificações realizadas para avaliar se essa técnica de fato contribui para o aumento da pureza e quais são as consequências para o rendimento da proteína de interesse.

Conforme mencionado em 3.2.1.3, a eluição central de cada CTA feita no presente trabalho foi fracionada em dez subfrações de volumes idênticos, que foram recolhidas separadamente utilizando o coletor do Äkta Avant 150 e armazenadas em tubos de 50 mL na geladeira a 6°C. Posteriormente, foi feita a caracterização de cada uma das subfrações por meio das medidas de massa de proteínas solúveis totais, pureza e rendimento de PspA4Pro. O procedimento citado também foi realizado para o pool de proteínas representativo de cada purificação, o qual foi formado do modo como será explicado nos parágrafos sucessivos.

Para as purificações 1, 2 e 3 foi preparado o pool representativo da eluição central por meio da reunião do volume total de cada subfração coletada num béquer, totalizando em torno de 370 mL. O conteúdo de cada pool foi homogeneizado, sendo feita a retirada de 2 amostras de 2 mL de cada um e inserindo-as em tubos eppendorf. Contudo, a caracterização do pool constituído para a P1 e para a P3 foi comprometida devido ao fato das amostras de 2 mL terem sido deixadas mais de um mês na geladeira, sem o devido congelamento, o que ocasionou a deterioração das proteínas por micro-organismos. Como segunda alternativa, a pureza do pool das purificações

1 e 3 foi determinada como sendo a média das purezas estimadas para cada subfração da eluição central, exceto as subfrações Q250_1 e Q250_10 na P1 e Q300_1 e Q300_10 na P3, devido à baixa quantidade de proteínas totais encontradas nessas amostras.

Nas três primeiras purificações, foram observados os maiores valores de pureza em PspA4Pro nas subfrações coletadas na eluição central após a cromatografia de troca aniônica. Portanto, foi decidido aplicar a etapa de crioprecipitação a pH 4,0, que será detalhada no próximo tópico, ao pool formado de cada uma das três purificações para elevar a pureza da proteína de interesse.

Como as purezas mais elevadas foram encontradas nas subfrações iniciais da eluição central nas purificações 1, 2 e 3, foi concluído que seria interessante a realização da crioprecipitação a pH 4,0 de forma individual para cada subfração nas próximas purificações (P4, P5 e P6), além de executar o mesmo procedimento para o pool representativo. Com base nisso, foi decidido preparar a composição do pool representativo das três últimas purificações utilizando 10 mL de cada uma das subfrações da eluição central num béquer, resultando no volume final de 100 mL. O conteúdo foi homogeneizado e foram retiradas duas amostras de 2 mL, colocando-as em tubos eppendorf. O volume restante de cada subfração, em torno de 25 mL, foi utilizado para a crioprecipitação individual de cada uma, conforme é descrito no próximo tópico.

3.2.1.5. Crioprecipitação a pH 4,0

A etapa de crioprecipitação tem a finalidade de aumentar a pureza em PspA4Pro no produto final da purificação, buscando atingir o valor mínimo de 95% estabelecido pelos órgãos de regulação (FIGUEIREDO, 2014). Assim, a crioprecipitação foi aplicada às frações coletadas na eluição central, as quais apresentaram a maior pureza em PspA4Pro após a etapa de cromatografia de troca aniônica.

Para a realização da crioprecipitação, o conteúdo de cada pool formado nas seis purificações foi homogeneizado e com o gotejamento de uma solução de ácido acético a aproximadamente 1 mol.L⁻¹ os valores de pH foram ajustados para 4,0. Os materiais foram dispostos em seis recipientes distintos de 500 mL e armazenados

num freezer a -20°C pelo tempo mínimo de 24 horas.

Após o período de congelamento, cada pool foi descongelado inserindo o recipiente numa bacia com água a temperatura ambiente e a suspensão resultante foi centrifugada a 10000 rpm por 1 hora a 10°C . Foi realizada a filtração a $0,45\ \mu\text{m}$ dos seis sobrenadantes coletados após a centrifugação. Os filtrados obtidos foram homogeneizados e duas amostras de 2 mL de cada um deles foram retiradas e armazenadas em tubos eppendorf.

Todas as alíquotas coletadas ao longo das purificações que foram armazenadas nos tubos eppendorf foram guardadas na geladeira a 6°C para análise posterior.

No caso das purificações 4, 5 e 6, além do pool representativo da eluição central, também foi aplicado o processo de crioprecipitação individual a todas as dez subfrações da eluição central, contendo cada uma delas, aproximadamente, 25 mL. O pH de cada subfração foi corrigido para 4,0 adicionando alíquotas de uma solução de ácido acético. Posteriormente, os dez frascos armazenando em torno de 25 mL cada um foram colocados no freezer a -20°C por um período de, pelo menos, 24 horas.

Após o descongelamento, as dez amostras das subfrações da eluição central foram centrifugadas, filtradas e armazenadas, conforme descrito para o pool.

3.3. Métodos analíticos

Todas as alíquotas recolhidas em cada etapa do processo (lisados celulares, clarificados obtidos após precipitação por CTAB, frações das cromatografias de troca aniônica e sobrenadantes das crioprecipitações) foram analisadas para determinar a concentração em proteína solúvel total e a pureza em PspA4Pro.

3.3.1. Quantificação da concentração de proteínas solúveis totais pelo método BCA

O método BCA foi usado para a determinação da concentração de proteínas totais em cada amostra de acordo com o procedimento descrito em Smith *et al.*

(1985).

A primeira etapa do procedimento consistiu em preparar uma curva padrão com soluções de diferentes concentrações de BSA em água destilada, sendo elas 0,04, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5 e 2 mg/mL. Foram inseridos 25 μ L de cada solução nos poços da placa BCA, separando três poços para cada uma.

O próximo passo foi realizar as diluições das amostras recolhidas dos materiais gerados durante o processo de purificação conforme a necessidade, com o objetivo de manter as concentrações dentro dos valores limites da curva padrão. Foram adicionados 25 μ L de cada amostra diluída nos poços da placa BCA, usando, também, três poços para cada uma.

Em seguida, foram transferidos 200 μ L de uma mistura dos reagentes A (carbonato de sódio, bicarbonato de sódio, ácido bicinconínico e tartarato de sódio em hidróxido de sódio 0,1 mol.L⁻¹) e B (solução aquosa de sulfato de cobre 4% m/v) para cada poço. O volume em μ L de B foi calculado pela divisão do volume total requerido da mistura em μ L por 51. Já o volume de A em μ L foi determinado pela multiplicação do volume de B em μ L por 50.

Após a adição da mistura dos componentes A e B nos poços, a placa BCA foi coberta por uma placa de plástico negra para evitar a exposição das soluções à luz, devido à sensibilidade dos reagentes. A placa BCA revestida foi levemente agitada por 15 segundos e, em seguida, posicionada numa estufa a 37°C por 30 minutos.

Finalmente, a placa foi encaixada num leitor de placas UV-Visível, tendo sido feita a leitura de cada poço e obtidas as absorvâncias no comprimento de onda de 595 nm.

Foi feita a média das absorvâncias de cada substância, eliminando os valores atípicos. Utilizando a equação da curva padrão determinada, foram calculadas as concentrações de proteínas totais em mg/mL usando os resultados de absorvância média dos materiais. Para obter as concentrações reais de proteínas totais em mg/mL nas respectivas amostras, os valores das concentrações estimadas no cálculo anterior foram multiplicados pela diluição correspondente, se fosse o caso.

3.3.2. Determinação da pureza da PspA4Pro por SDS-PAGE

A determinação da pureza em PspA4Pro nas amostras recolhidas dos materiais gerados durante o processo de purificação foi realizada por eletroforese SDS-PAGE (GALLAGHER, 2012). Para a execução da eletroforese das amostras das purificações 1, 2 e 3 foram selecionados géis de poliacrilamida a 10% da empresa Bio-Rad contendo 10 poços de 50 μL cada. Na P4 e na P5 foram usados géis de poliacrilamida a 12% da mesma empresa contendo 10 poços de 30 μL , em razão de os géis a 10% terem acabado. Para a eletroforese dos materiais da P6, foram comprados e utilizados géis idênticos aos empregados nas três primeiras purificações.

Os marcadores moleculares das eletroforeses incluíram fosforilase (97 kDa), albumina (66 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (31 kDa), tripsina (21 kDa), lactalbumina (14 kDa) e aprotinina (7 kDa).

Foi selecionado o volume de 15 μL das substâncias para ser inserido em cada poço dos géis. Desta maneira, se os volumes estimados fossem inferiores a 15 μL , eles deveriam ser completados com água destilada até atingirem o número mencionado. As amostras foram dispostas, primeiramente, em tubos eppendorf.

O tampão de eletroforese foi então adicionado em cada amostra, o qual foi constituído por Laemmli e β -mercaptoetanol, cujas quantidades colocadas em cada tubo foram, respectivamente, 5 e 0,5 μL . Foi separado um eppendorf contendo 3 μL do marcador de proteínas. Os tubos foram então agitados e aquecidos a 98°C por 3 minutos com o uso de um aquecedor de tubos para desnaturar as proteínas presentes nas amostras. Este procedimento também foi feito para o marcador.

Posteriormente, os géis foram encaixados no suporte adequado para a eletroforese, o qual foi preenchido com 1 L de uma solução tampão de tris-glicina diluída 10 vezes com água destilada. A estrutura permitiu o encaixe de dois géis. Foram feitas as injeções das amostras nos poços dos géis, tendo cada um deles um poço no qual foi colocado o marcador. Foi conectada uma fonte de energia elétrica no sistema montado, estabelecendo a diferença de potencial necessária para a migração das proteínas nos géis. A tensão selecionada foi de 200 V e o tempo do processo foi de 35 minutos.

As etapas de montar a estrutura com dois géis, injetar as substâncias e

conectar o sistema à fonte foram repetidas até completar as análises de todas as amostras das seis purificações.

Após a passagem das proteínas pelos géis, eles foram removidos do suporte, colocados em recipientes e lavados 3 vezes com água destilada por 5 minutos sob agitação, substituindo a água a cada lavagem. Sucessivamente, a água da última lavagem foi descartada e foram adicionados 50 mL de um corante a cada gel, mantendo-os agitados por 1 hora. Por fim, o corante foi retirado e foi adicionada água destilada aos géis para descorá-los, conservando-os nos recipientes sob agitação por um tempo mínimo de 30 minutos.

Os géis descorados foram colocados num densitômetro Locus DS-5000 calibrado e escaneados, tendo suas imagens analisadas com o uso do software ImageLab v. 6.0. Por meio da densitometria de bandas (VILELA *et al.*, 2020) foi possível determinar a pureza da PspA4Pro (%) em todas as amostras das seis purificações.

3.4. Cálculos de balanço de massa, fator de purificação e rendimento

Os dados obtidos para a concentração de proteínas solúveis totais e a pureza em PspA4Pro nas análises das amostras dos processos de purificação foram empregados para avaliar o balanço de massa, o fator de purificação e o rendimento.

Para determinar as massas (em g) de proteínas totais das amostras, os volumes totais (em mL) coletados em cada etapa do processo de purificação foram multiplicados pelas concentrações reais de proteínas totais (em mg/mL) obtidas pelo método BCA, dividindo o valor final por 1000 (FIGUEIREDO *et al.*, 2017).

Para obter as massas de PspA4Pro em g contidas em cada material gerado nas etapas do processo de purificação, os valores de pureza estimados pela metodologia descrita em 3.3.2. foram multiplicados pelas massas de proteínas totais correspondentes (FIGUEIREDO *et al.*, 2017).

O balanço de massa para as proteínas solúveis totais e para a PspA4Pro foi realizado considerando as principais etapas do processo de purificação. No caso da cromatografia, foram estipuladas as massas de proteínas totais e de PspA4Pro do clarificado, da fração não adsorvida, das frações e subfrações de eluição. A corrente

de entrada da coluna cromatográfica foi correspondente ao clarificado e a de saída, aos outros materiais mencionados (FIGUEIREDO *et al.*, 2017).

Já com relação à crioprecipitação, foi analisada a massa de proteínas solúveis totais e de PspA4Pro das amostras antes e depois do processo, para verificar se houve perda de massa em relação ao pool inicial (FIGUEIREDO *et al.*, 2017).

Foram ainda determinados o fator de purificação e o rendimento globais (%) de todos os materiais gerados no processo de purificação, tendo como referência o clarificado. Para isso, foram utilizados os dados de pureza e massa de PspA4Pro obtidos nos cálculos anteriores.

O fator de purificação global foi calculado por meio da divisão dos valores de pureza encontrados nas frações pela pureza do material de partida da respectiva purificação (PESSOA; KILIKIAN, 2005), ou seja, do clarificado, como apresentado na Equação 16.

$$FP_i = \frac{\text{Pureza da PspA4Pro na fração } i \text{ (\%)}}{\text{Pureza da PspA4Pro no clarificado (\%)}} \quad (16)$$

Também foi calculado o fator de purificação para a crioprecipitação (PESSOA; KILIKIAN, 2005). O raciocínio está mostrado na Equação 17.

$$FP_{crio} = \frac{\text{Pureza da PspA4Pro após a crio. (\%)}}{\text{Pureza da PspA4Pro antes da crio. (\%)}} \quad (17)$$

Já o rendimento global foi estimado dividindo as massas de PspA4Pro de cada uma das frações pela massa de PspA4Pro presente no clarificado da respectiva purificação (PESSOA; KILIKIAN, 2005). O valor final foi multiplicado por 100, conforme indica a Equação 18.

$$R_i \text{ (\%)} = \frac{\text{Massa da PspA4Pro na fração } i \text{ (g)}}{\text{Massa da PspA4Pro no clarificado (g)}} \cdot 100\% \quad (18)$$

Foi determinado o rendimento para a crioprecipitação, com a finalidade de conferir a massa de PspA4Pro recuperada no processo (PESSOA; KILIKIAN, 2005). O cálculo está demonstrado na Equação 19.

$$R_{crio} \text{ (\%)} = \frac{\text{Massa da PspA4Pro após a crio.}}{\text{Massa da PspA4Pro antes da crio.}} \cdot 100\% \quad (19)$$

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Modelo para a cromatografia de troca aniônica aplicado à ClearColi®

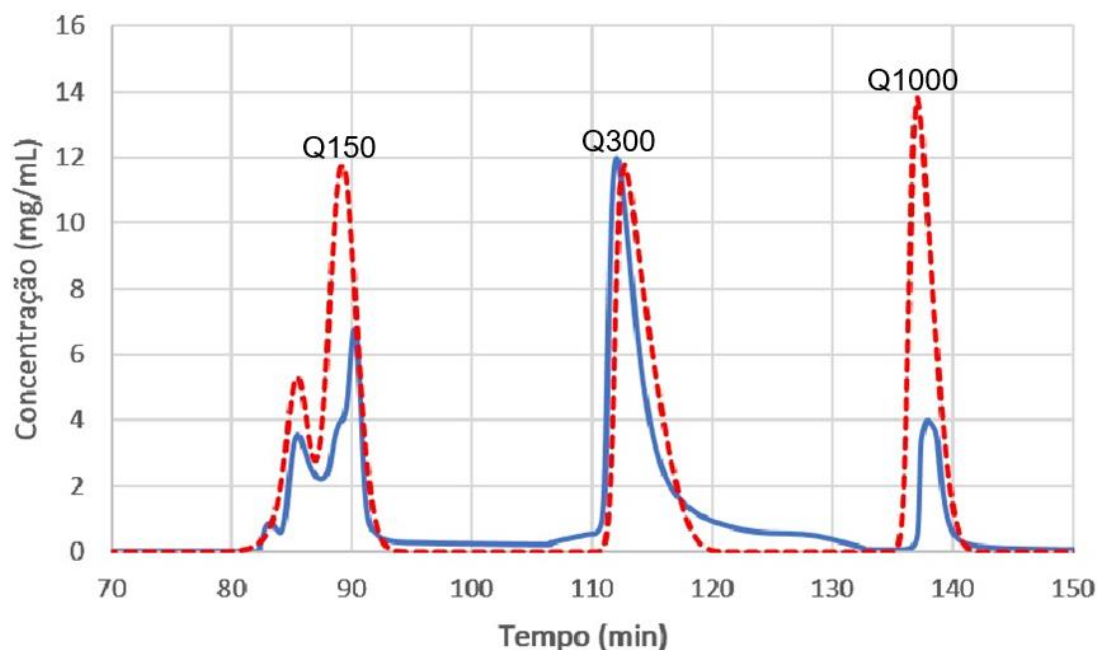
Para dar início ao projeto, foi verificado se o modelo proposto por Benedini *et al.* (2020) seria adequado para descrever a cromatografia de troca aniônica de clarificado celular obtido a partir de biomassa de ClearColi®. É importante lembrar que o referido modelo foi desenvolvido e validado para clarificados celulares obtidos a partir de biomassas de *E. coli* BL21(DE3) convencional, produtoras de PspA4Pro. Daí a importância de avaliar o desempenho do modelo com clarificados celulares ClearColi®, por se tratar de outra plataforma de expressão da PspA4Pro. O modelo de Benedini *et al.* (2020) utiliza a isoterma de ação em efeito estérico combinada com o Modelo do Equilíbrio Dispersivo (MED) (GUIOCHON *et al.*, 2006), e foi usado para simular o perfil da cromatografia de troca aniônica de uma purificação com clarificado celular de ClearColi® (BENEDINI *et al.*, 2020), comparando o resultado com o perfil obtido experimentalmente no trabalho de Cardoso *et al.* (2022), no qual foi feita a purificação da PspA4Pro produzida por meio do cultivo de ClearColi®. As simulações foram realizadas por Benedini e os resultados estão apresentados na Figura 11.

Conforme é mostrado na Figura 11, notadamente na fração Q300, o tempo de residência dos picos de ambas as curvas foi praticamente o mesmo, tendo, também, alturas muito parecidas. Dessa maneira, é possível dizer que o modelo proposto por Benedini *et al.* (2020) se ajustou bem aos dados experimentais da purificação relatada por Cardoso *et al.* (2022), descrevendo de forma adequada a cromatografia de troca aniônica do clarificado da ClearColi®.

Além disso, a comparação do perfil experimental de eluição apresentado na Figura 11 (para clarificado de ClearColi®) mostrou semelhanças com o obtido nas purificações realizadas por Figueiredo (2014) com o clarificado de *E. coli* BL21(DE3) convencional, sugerindo que as condições de eluição indicadas nos estudos de Benedini (2019) podem também melhorar os resultados de pureza para clarificados celulares obtidos a partir de ClearColi®. Desta forma, a etapa de cromatografia de troca aniônica foi conduzida empregando duas estratégias para comparação: o protocolo desenvolvido por Figueiredo (2014) e o protocolo proposto por Benedini (2019), os quais estão descritos em Materiais e Métodos. Nos próximos tópicos, estão

reunidos os resultados das etapas de cromatografia de troca aniônica e de crioprecipitação para cada uma das purificações.

Figura 11 – Comparação entre o perfil obtido da purificação com ClearColi® e o modelo de Benedini *et al.* (2020).



Fonte: Cedido por Benedini.

4.2. Purificações

Nos itens 4.2.1. a 4.2.6 estão descritos os resultados obtidos para cada um dos seis estudos de purificação da PspA4Pro realizados de acordo com as justificativas apresentadas no item 3.2. As condições de purificação estão resumidas na Tabela 3. Os dados determinados para cada fração das purificações incluem a massa de proteínas solúveis totais, as imagens dos géis de eletroforese, a pureza da PspA4Pro e o fator de purificação e rendimento globais. Também foram calculados o fator de purificação e o rendimento para a etapa de crioprecipitação utilizando as Equações 17 e 19.

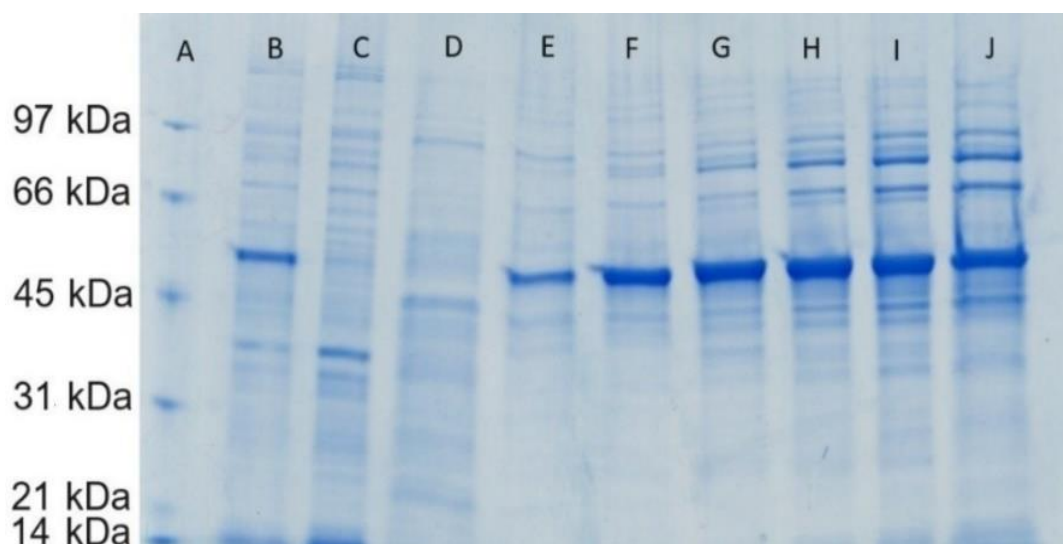
4.2.1. Purificação 1

Conforme mostra a Tabela 3 e está descrito em 3.2.1.3, P1 foi conduzida de acordo com o protocolo proposto por Benedini (2019) a partir do clarificado celular obtido em cultivo de ClearColi® em meio complexo. As Figuras 12 e 13 representam as imagens das bandas das proteínas de cada uma das frações da P1 indicadas pelos géis de eletroforese.

A Tabela 5 apresenta os resultados de massa de proteínas totais, pureza e massa de PspA4Pro e, também, os dados de fator de purificação e rendimento obtidos na P1. As purezas foram determinadas utilizando as imagens dos géis apresentadas nas Figuras 12 e 13 por densitometria.

A fração da eluição central foi dividida em dez subfrações, contudo, duas delas tiveram um valor muito baixo de massa de proteínas totais e não foram analisadas nas etapas posteriores. As 8 subfrações restantes são representadas pelos símbolos de Q250_2 a Q250_9.

Figura 12 – Frações da purificação P1 no gel 10% SDS-PAGE. A) Marcador molecular. B) Clarificado. C) QNAds. D) Q100. E) Q250_2. F) Q250_3. G) Q250_4. H) Q250_5. I) Q250_6. J) Q250_7.

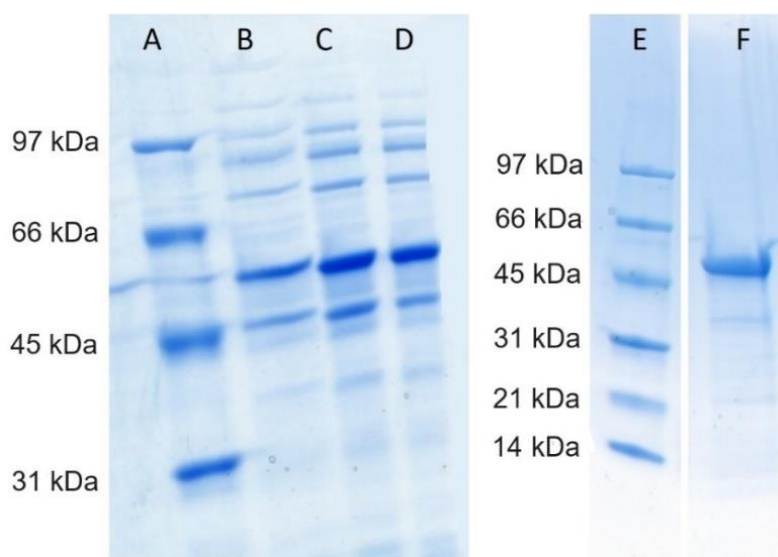


Fonte: Autor.

Com relação à análise do pool formado por todas as subfrações da Q250, foi visível a ocorrência da degradação das proteínas, pelo fato de haver a sobreposição

de muitas bandas na coluna correspondente à amostra do pool (não mostrada nas imagens). Isso aconteceu devido ao fato de a alíquota do pool não ter sido congelada e sido avaliada dois meses após a purificação. Dessa forma, a amostra do pool foi descartada e a pureza foi determinada como sendo a média das purezas das 8 subfrações que foram examinadas.

Figura 13 – Frações da purificação P1 em dois géis 10% SDS-PAGE. As amostras de A a D são pertencentes a um gel e as de E e F, a outro gel. A) Marcador molecular. B) Q250_8. C) Q250_9. D) Q1000. E) Marcador molecular. F) Pool após a crioprecipitação.



Fonte: Autor.

A análise dos resultados de balanço de massa será realizada de forma conjunta para as seis purificações em 4.3.1, tanto para a etapa de cromatografia de troca aniônica quanto para a crioprecipitação.

Conforme era esperado, a pureza do clarificado (58,81%) foi superior à encontrada no clarificado da purificação feita por Cardoso *et al.* (2022), uma vez que a biomassa utilizada na P1 apresentava rendimento em PspA4Pro igual a 175 mg PspA4Pro/g células, maior se comparado ao de Cardoso *et al.* (2022), que foi de 145 mg PspA4Pro/g células.

Houve a ocorrência do aumento de temperatura durante o rompimento celular utilizando o Panda Plus, que pode ter causado a desnaturação parcial da proteína de interesse e, também, ter aumentado a solubilidade dos contaminantes proteicos na amostra, dificultando a precipitação deles com o uso do CTAB, na etapa posterior. Os

fatores citados podem ter influenciado negativamente na pureza do clarificado. Essa falha na etapa de rompimento celular foi corrigida a partir da P3, por meio da metodologia descrita no capítulo anterior. Antes de executar a P3, foi feito um estudo do aumento da temperatura durante a lise celular utilizando outra biomassa, que será explicado no tópico 4.2.2.

Tabela 5 – Resultados da P1. Biomassa obtida no cultivo 2, conduzido em meio complexo, com indução por IPTG 0,7 mmol.L⁻¹. Purificação realizada com protocolo de Benedini (2019).

Fração	Massa de proteínas totais (g)	Pureza da PspA4Pro (%)	Massa de PspA4Pro (g)	Fator de purificação global	Rendimento global (%)
Clarificado	2,993	58,81	1,760	1,00	100,00
QNAbs	1,510	8,30	0,125	0,14	7,12
Q100	0,369	0,00	0,000	0,00	0,00
Q250_2	0,298	91,17	0,272	1,55	15,44
Q250_3	0,283	86,99	0,246	1,48	13,97
Q250_4	0,143	74,74	0,107	1,27	6,07
Q250_5	0,071	66,74	0,047	1,13	2,68
Q250_6	0,044	46,06	0,020	0,78	1,14
Q250_7	0,031	39,15	0,012	0,67	0,68
Q250_8	0,021	50,30	0,011	0,86	0,61
Q250_9	0,018	48,40	0,009	0,82	0,50
Q1000	0,216	55,70	0,120	0,95	6,84
Pool Crio.	1,161	88,05	1,022	1,50	58,08

Ainda analisando os dados da Tabela 4, o baixo valor de pureza da PspA4Pro na fração não adsorvida, de 8,30%, indica alta afinidade da molécula-alvo com a

resina utilizada na coluna cromatográfica, com uma pequena quantidade de PspA4Pro não retida na coluna durante o processo. A pureza da PspA4Pro na fração Q100 foi nula. A fração Q1000 forneceu uma pureza maior, de 55,70%, com rendimento global de 6,84%.

As purezas medidas nas frações Q100 e Q1000 não foram coerentes com o esperado, porque era previsto um valor alto de pureza na Q100 e mais baixo na Q1000. Isso pode ser justificado pela possibilidade de ter ocorrido o descontrole de algum parâmetro durante a cromatografia, podendo ter feito com que a proteína de interesse adquirisse um excesso de cargas negativas. Consequentemente, a proteína-alvo pode ter ficado mais fortemente aderida à resina utilizada na coluna, tornando difícil a eluição com o uso da concentração de 100 mmol.L⁻¹, o que explica a baixa pureza encontrada na fração Q100. Utilizando o mesmo raciocínio, a eluição da molécula-alvo pode ter ocorrido com mais facilidade com o uso de uma concentração mais alta de NaCl, explicando a alta pureza atingida na fração Q1000.

Foi observado que nas três primeiras subfrações da eluição central, foram obtidos os maiores valores de pureza da PspA4Pro, o que é consistente com as constatações dos estudos de Benedini (2019) utilizando clarificados celulares de *E. coli* convencional. O fator de purificação e o rendimento também foram mais altos nas subfrações mencionadas. A amostra da Q250_2 apresentou os melhores resultados.

Foi feita uma média dos resultados de pureza das subfrações utilizadas da eluição central, resultando em 62,94%. O fator de purificação foi calculado considerando o valor mencionado e obteve-se 1,07. O rendimento global foi estimado utilizando a soma das massas de PspA4Pro encontradas em cada subfração, resultando no valor de 41,08% para o rendimento.

A respeito dos dados da amostra do pool após a crioprecipitação, foi utilizada a Equação 17 e obtido o fator de purificação da crioprecipitação de 1,40, indicando um aumento da pureza da PspA4Pro nessa quantidade de vezes. O rendimento da crioprecipitação estimado por meio da Equação 19 foi aproximadamente 100%, indicando a recuperação de toda a massa da PspA4Pro em relação ao pool antes da crioprecipitação. A massa de proteínas totais também foi totalmente recuperada no processo. Também foram obtidos fator de purificação e rendimento interessantes em relação ao clarificado, de 1,50 e 58,08%, respectivamente.

Apesar de a pureza de pelo menos 95% não ter sido atingida, os resultados

obtidos na P1 sugeriram que talvez o objetivo pudesse ser conseguido por meio da crioprecipitação das subfrações individuais da eluição central, principalmente, as iniciais, as quais apresentaram as purezas mais elevadas. O procedimento foi adotado a partir da P4.

4.2.2. Purificação 2

Conforme mostra a Tabela 3 (Materiais e Métodos) e está descrito em 3.2.1.3, P2 foi conduzida de acordo com o protocolo proposto por Benedini (2019) a partir de clarificado celular obtido em cultivo de ClearColi® em meio definido. As Figuras 14 e 15 apresentam os resultados para as amostras relacionadas à P2 obtidas nos géis de eletroforese.

Apenas a subfração Q250_1 da eluição central não foi utilizada no ensaio SDS-PAGE, devido ao valor baixo de massa de proteínas totais. As outras 9 subfrações foram simbolizadas por Q250_2 a Q250_10.

Foi construída a Tabela 6 com os resultados de massa de proteínas totais, pureza e massa de PspA4Pro, fator de purificação e rendimento de cada uma das frações da P2. Por meio do estudo das imagens dos géis mostradas nas Figuras 14 e 15, foram estimadas as purezas.

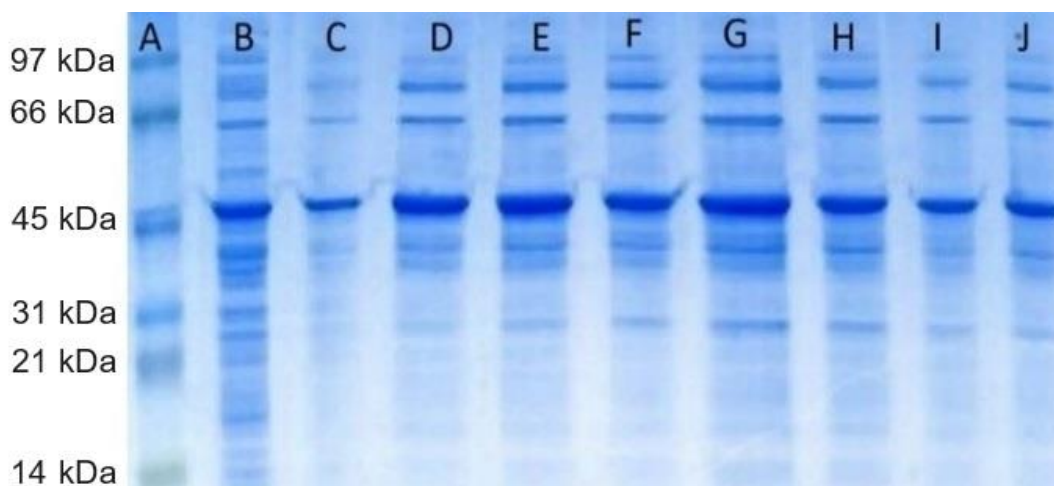
A análise dos resultados de balanço de massa será realizada de forma conjunta para as seis purificações em 4.3.1, tanto para a etapa de cromatografia de troca aniônica quanto para a crioprecipitação.

A respeito da alíquota do clarificado, cuja coluna no gel de eletroforese corresponde à coluna B da Figura 14, foi visível uma quantidade grande de contaminantes representados pelas várias bandas abaixo da banda da PspA4Pro. O resultado foi um valor abaixo do esperado da pureza da PspA4Pro, igual a 28,47%, conforme está indicado na Tabela 6.

Ocorreu, novamente, a elevação da temperatura da suspensão a cada passagem pelo homogeneizador de alta pressão durante o rompimento celular, podendo ter desnaturado de forma parcial a PspA4Pro e aumentado a solubilidade dos contaminantes proteicos na amostra, dificultando a precipitação deles com o uso do CTAB na operação posterior e prejudicando o resultado final de pureza do

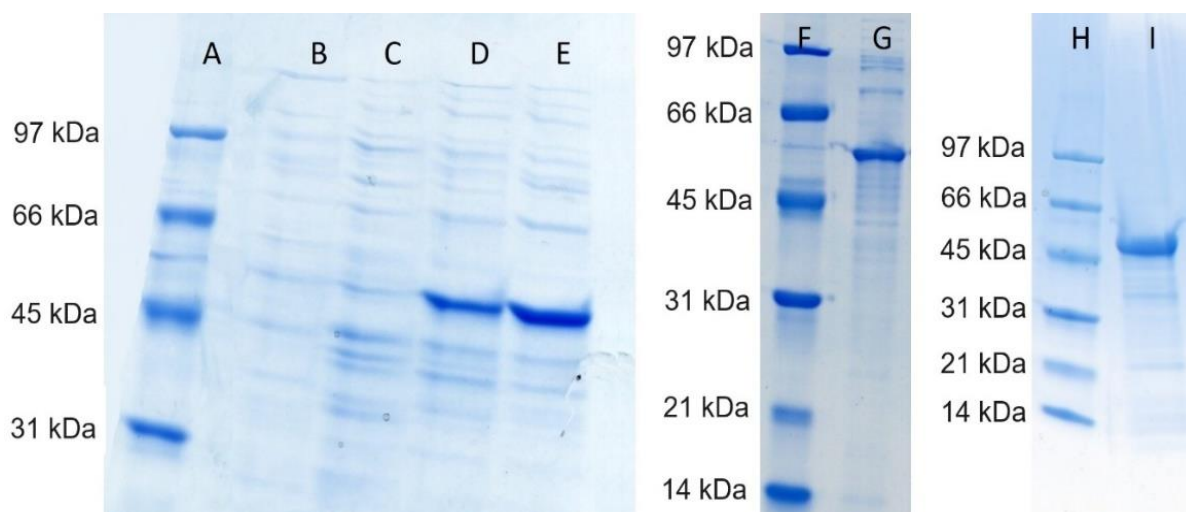
clarificado. Conforme foi citado no t3pico anterior, foi feito um estudo do aumento da temperatura durante a lise celular utilizando outra biomassa antes de executar a P3, que ser3a detalhado ap3s a discuss3o dos resultados da P2.

Figura 14 – Fra33es da purifica33o P2 no gel 10% SDS-PAGE. A) Marcador molecular. B) Clarificado. C) Q250_4. D) Q250_5. E) Q250_6. F) Q250_7. G) Q250_8. H) Q250_9. I) Q250_10. J) Q1000.



Fonte: Autor.

Figura 15 – Fra33es da purifica33o P2 em tr3s g3is 10% SDS-PAGE. A) Marcador molecular. B) QNAds. C) Q100. D) Q250_2. E) Q250_3. F) Marcador molecular. G) Pool. H) Marcador molecular. I) Pool ap3s a crioprecipita33o.



Fonte: Autor.

Tabela 6 – Resultados da P2. Biomassa obtida no cultivo 3, conduzido em meio definido, com indução por IPTG 0,7 mmol.L⁻¹. Purificação realizada com protocolo de Benedini (2019).

Fração	Massa de proteínas totais (g)	Pureza da PspA4Pro (%)	Massa de PspA4Pro (g)	Fator de purificação global	Rendimento global (%)
Clarificado	2,428	28,47	0,691	1,00	100,00
QNAbs	1,175	0,00	0,000	0,00	0,00
Q100	0,573	0,00	0,000	0,00	0,00
Q250_2	0,130	67,07	0,087	2,36	12,58
Q250_3	0,221	80,00	0,177	2,81	25,59
Q250_4	0,115	46,08	0,053	1,62	7,64
Q250_5	0,063	42,26	0,026	1,48	3,83
Q250_6	0,048	41,34	0,020	1,45	2,84
Q250_7	0,031	40,23	0,013	1,41	1,82
Q250_8	0,023	29,88	0,007	1,05	1,01
Q250_9	0,018	29,80	0,005	1,05	0,78
Q250_10	0,015	40,69	0,006	1,43	0,89
Q1000	0,204	40,19	0,082	1,41	11,89
Pool	1,786	57,83	1,033	2,03	≅100,00
Pool Crio.	0,881	76,98	0,678	2,70	98,13

A pureza da PspA4Pro na fração Q100 na P2 foi nula e na fração Q1000, de 40,19%, indicando a ocorrência do mesmo problema observado na purificação anterior, sendo possível que a proteína de interesse tenha adquirido um excesso de cargas negativas devido à perda de controle de algum parâmetro durante a cromatografia. Dessa forma, a pureza na fração Q100 pode ter sido mais baixa devido às fortes interações entre a molécula-alvo e a resina na coluna, dificultando a eluição

com o uso de uma concentração mais baixa de NaCl, de 100 mmol.L⁻¹. De modo similar, a pureza mais alta na fração Q1000 pode ter sido decorrente da facilidade de eluição da proteína-alvo com o uso de concentração mais elevada de NaCl, de 1000 mmol.L⁻¹.

Foi constatada, mais uma vez, a obtenção de melhores resultados nas primeiras subfrações da Q250, com destaque para Q250_2 e Q250_3. Essas amostras também exibiram fatores de purificação mais altos, mas é preciso levar em conta a ocorrência disso em maior parte por causa do baixo valor da pureza do material de partida. A subfração Q250_3 teve os melhores dados de pureza, fator de purificação e rendimento. Estudando os resultados atingidos no pool Q250 da P2 após a crioprecipitação, foi registrado o fator de purificação da crioprecipitação de 1,33 e rendimento da crioprecipitação aproximadamente igual a 100%, indicando a recuperação de toda a massa de PspA4Pro do pool inicial.

4.2.3. Análise da elevação da temperatura durante o rompimento celular

Antes da execução da P3, foi decidida a realização de um estudo sobre a variação da temperatura e da densidade ótica (DO) durante o rompimento celular. Para isso, foi realizada a ressuspensão de 30 g da biomassa do cultivo 1 em 300 mL de tampão de lise, seguindo o mesmo procedimento descrito em 3.2.1.1. A amostra foi inserida num recipiente, que foi disposto numa caixa de isopor com gelo. O reservatório contendo o material foi enviado ao Panda Plus para a lise celular, sendo escolhida a pressão de operação de 1200 bar.

Após cada passagem do conteúdo pelo homogeneizador de alta pressão, foi feita a medida da temperatura utilizando um termômetro digital e foi analisada a DO do material utilizando um espectrofotômetro, sendo desejado um valor final abaixo de 5. Antes de inserir a amostra novamente no equipamento, ela foi resfriada na caixa de isopor com gelo por, pelo menos, 3 minutos. As temperaturas e as densidades óticas registradas estão apresentadas na Tabela 7.

De acordo com os dados da Tabela 7, o limite de 35°C colocado para a etapa de ruptura celular não foi excedido e, quando foi feito o intervalo de tempo entre as passagens pelo equipamento juntamente com o resfriamento da amostra no gelo, a temperatura não apresentou grande elevação. Além disso, a densidade ótica final do

material ficou abaixo de 5 após a quarta passagem pelo homogeneizador de alta pressão, conforme tinha sido desejado. Dessa maneira, o rompimento celular a partir da P3 foi realizado de forma idêntica à apresentada no estudo.

Tabela 7 – Estudo da variação da temperatura e da DO durante a lise celular.

Momento das análises	Temperatura (°C)	Densidade ótica
Antes da lise celular	18,0	-
Após a 1ª passagem pelo Panda Plus	23,7	15,08
Após a 2ª passagem pelo Panda Plus	25,1	14,02
Após a 3ª passagem pelo Panda Plus	26,4	6,42
Após a 4ª passagem pelo Panda Plus	27,0	4,44

4.2.4. Purificação 3

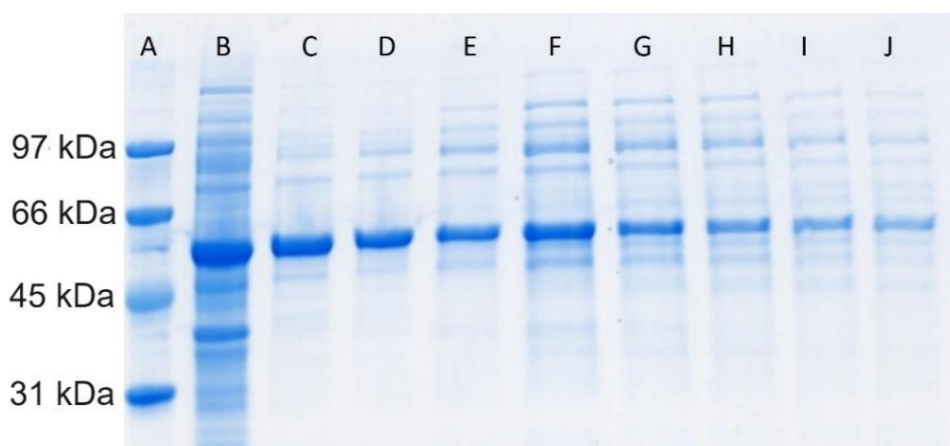
Foi decidida a realização de uma nova purificação em meio complexo utilizando o mesmo protocolo de eluição utilizado por Cardoso *et al.* (2022), que reproduziu a estratégia de Figueiredo (2014), porém em clarificados celulares obtidos em meio definido. Assim, o objetivo da P3 foi avaliar a influência do meio de cultivo nos resultados das purificações. Ainda na P3 foi corrigido o procedimento de lise celular para evitar o aumento da temperatura. As Figuras 16 e 17 mostram a corrida das amostras da P3 nos géis de eletroforese SDS-PAGE.

Nesta purificação, as subfrações Q300_1 e Q300_10 da eluição não tiveram quantidade suficiente de proteínas totais para o ensaio de eletroforese. As subfrações utilizadas foram as simbolizadas por Q300_2 até Q300_9.

A alíquota do pool composta por todas as dez subfrações da Q300 teve as proteínas degradadas em razão de não ter sido congelada, sendo disposta na geladeira por um tempo prolongado, o que favoreceu a deterioração da amostra por micro-organismos. A degradação foi visível pelas várias bandas de cor escura sobrepostas na coluna correspondente à amostra do pool no gel (resultados não mostrados). Dessa maneira, a alíquota do pool foi descartada e a pureza foi estimada

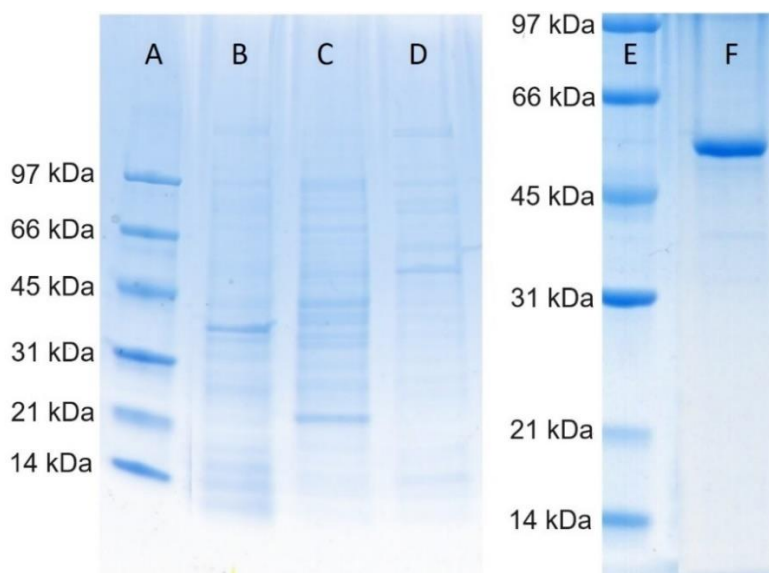
como sendo a média das purezas das 8 subfrações da eluição central utilizadas no estudo.

Figura 16 – Frações da purificação P3 no gel 10% SDS-PAGE. A) Marcador molecular. B) Clarificado. C) Q300_2. D) Q300_3. E) Q300_4. F) Q300_5. G) Q300_6. H) Q300_7. I) Q300_8. J) Q300_9.



Fonte: Autor.

Figura 17 – Frações da purificação P3 em dois géis 10% SDS-PAGE. A) Marcador molecular. B) QNAds. C) Q150. D) Q1000. E) Marcador molecular. F) Pool após a crioprecipitação.



Fonte: Autor.

A Tabela 8 ilustra todos os dados estimados de massa de proteínas totais,

pureza e massa de PspA4Pro, fator de purificação e rendimento das amostras da P3. As purezas foram estimadas utilizando as imagens dos géis mostrados nas Figuras 15 e 16.

A análise dos resultados de balanço de massa será realizada de forma conjunta para as seis purificações em 4.3.1, tanto para a etapa de cromatografia de troca aniônica quanto para a crioprecipitação.

Tabela 8 – Resultados da P3. Biomassa obtida no cultivo 1, conduzido em meio complexo, com indução por IPTG 1,0 mmol.L⁻¹. Purificação realizada com protocolo de Figueiredo (2014).

Fração	Massa de proteínas totais (g)	Pureza da PspA4Pro (%)	Massa de PspA4Pro (g)	Fator de purificação global	Rendimento global (%)
Clarificado	7,099	46,66	3,312	1,00	100,00
QNAds	2,856	0,00	0,000	0,00	0,00
Q150	0,743	0,00	0,000	0,00	0,00
Q300_2	0,365	89,37	0,326	1,92	9,85
Q300_3	0,431	90,49	0,390	1,94	11,78
Q300_4	0,100	71,90	0,072	1,54	2,16
Q300_5	0,023	60,16	0,014	1,29	0,41
Q300_6	0,017	51,67	0,009	1,11	0,26
Q300_7	0,011	46,58	0,005	1,00	0,16
Q300_8	0,008	56,52	0,005	1,21	0,14
Q300_9	0,007	58,21	0,004	1,25	0,12
Q1000	0,080	0,00	0,000	0,00	0,00
Pool Crio.	0,878	95,49	0,839	2,05	25,32

A pureza da PspA4Pro foi nula nas frações Q150 e Q1000. Embora a pureza na fração Q150 tenha se comportado de modo similar como aconteceu nas

purificações anteriores, a pureza na fração Q1000 teve um comportamento mais próximo do esperado. Esta observação indica que a eluição da proteína de interesse ocorreu mais intensamente nas subfrações da eluição Q300, restando nenhuma quantidade de PspA4Pro para ser eluída na fração Q1000.

Pela terceira vez, os melhores resultados de pureza da PspA4Pro foram encontrados nas subfrações iniciais da eluição central, conforme previsto por Benedini (2019). Neste caso, foram atingidas purezas de 89,37% na Q300_2 e 90,49% na Q300_3. Os fatores de purificação nas duas parcelas citadas foram de 1,92 e 1,94, respectivamente, com rendimentos de 9,85% e 11,78%, respectivamente.

Ao fazer a média da pureza das parcelas da Q300, foi obtido 65,61%, juntamente com um fator de purificação igual a 1,41 e rendimento de 24,9%.

Relativamente à amostra do pool Q300 após a crioprecipitação, foi atingido o dado mais alto de pureza da PspA4Pro até então, 95,49%, com um fator de purificação da crioprecipitação de 1,46 e rendimento da crioprecipitação de aproximadamente 100%, indicando a recuperação de toda a massa da PspA4Pro em relação ao pool inicial.

A comparação com os resultados obtidos por Cardoso *et al.* (2022), assim como a análise da influência do meio, será abordada em 4.3.2 e 4.3.3.

4.2.5. Purificação 4

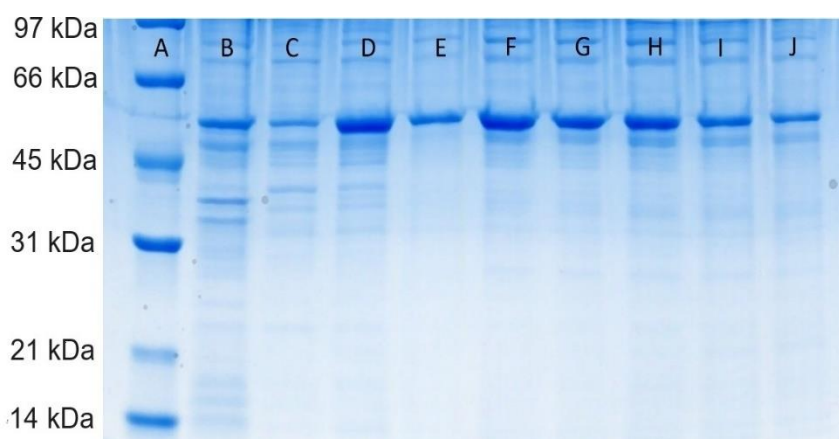
Conforme mostra a Tabela 4 (Materiais e Métodos) e está descrito em 3.2.1.3, P4 foi conduzida de acordo com o protocolo proposto por Benedini (2019) a partir do clarificado celular obtido em cultivo de ClearColi® em meio definido. Portanto, trata-se da repetição da purificação P2 (utilizando a mesma biomassa e protocolo da purificação), cujos resultados podem ter sido comprometidos devido à elevação de temperatura durante a etapa de rompimento celular.

As Figuras 18 e 19 ilustram a corrida das alíquotas da P4 nos géis de eletroforese SDS-PAGE.

Apenas a subfração Q250_1 da eluição central apresentou um valor baixo de massa de proteínas totais, não sendo utilizada na análise. A simbologia foi a mesma usada na P1 e na P2.

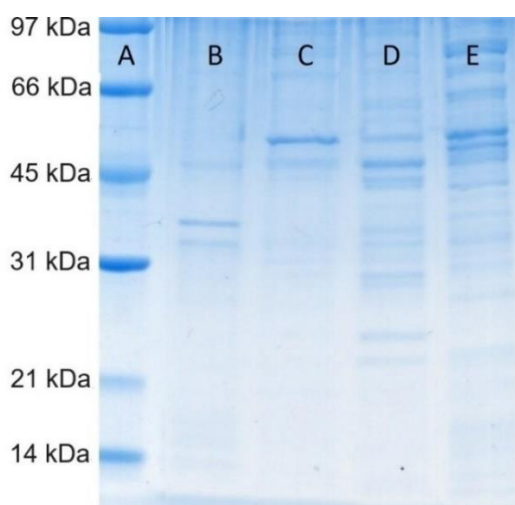
Foi feita a eletroforese das subfrações da Q250 após a crioprecipitação individual de cada uma, excetuando Q250_7, Q250_8, Q250_9 e Q250_10, nas quais foram obtidas massas de proteínas totais muito baixas. Contudo, ocorreram problemas durante a execução do procedimento mencionado nessas amostras e, também, nas alíquotas do pool inicial e do pool após a crioprecipitação. E como as amostras ficaram dez dias armazenadas na geladeira sem terem sido congeladas, elas foram deterioradas e foi decidido não repetir as análises desses materiais.

Figura 18 – Frações da purificação P4 no gel 12% SDS-PAGE. A) Marcador molecular. B) Clarificado. C) Q250_2. D) Q250_3. E) Q250_4. F) Q250_5. G) Q250_6. H) Q250_7. I) Q250_8. J) Q250_9.



Fonte: Autor.

Figura 19 – Frações da purificação P4 no gel 12% SDS-PAGE. A) Marcador molecular. B) QNAds. C) Q100. D) Q250_10. E) Q1000.



Fonte: Autor.

No caso da crioprecipitação, o erro referente ao pool Q250 pode estar associado ao menor volume utilizado para prepará-lo (100 mL), podendo ter alterado sua composição e, ainda, tornado o tempo de congelamento mais curto, não dando o período requerido para favorecer a precipitação dos contaminantes. O mesmo pode ter sucedido nas subfrações individuais da Q250, cujo volume congelado foi de apenas 25 mL.

Já com relação ao gel utilizado, é preciso lembrar que sua constituição era de 12% de poliácridamida e o volume dos poços era de 30 μL , ao contrário das purificações anteriores. Dessa maneira, o erro pode estar relacionado à constituição do próprio gel e às pipetagens das alíquotas. Também pode ter ocorrido imprecisão da densitometria de bandas.

A Tabela 9 apresenta os resultados de massa de proteínas totais, pureza e massa de PspA4Pro, fator de purificação e rendimento das frações da P4. As purezas foram estimadas com base nas imagens dos géis mostradas nas Figuras 17 e 18.

A análise dos resultados de balanço de massa será realizada de forma conjunta para as seis purificações em 4.3.1, tanto para a etapa de cromatografia de troca aniônica quanto para a crioprecipitação.

O resultado de pureza da PspA4Pro na fração Q100 da P4 foi 48,40% e na fração Q1000 foi de 18,10%. Estes resultados apresentam uma melhora em relação às purificações anteriores, uma vez que a pureza na fração Q100 foi mais alta, indicando maior facilidade de eluição da proteína-alvo com o uso de uma concentração mais baixa de NaCl. Ao mesmo tempo, foi obtida uma pureza mais baixa da PspA4Pro na fração Q1000, sendo uma evidência da baixa quantidade remanescente da proteína de interesse na eluição com 1000 mmol.L^{-1} de NaCl. A análise dos valores de pureza citados permite a compreensão de que a maior quantidade da PspA4Pro foi eluída nas subfrações da eluição central, conforme era esperado.

Os melhores valores de pureza foram observados nas subfrações Q250_4 e Q250_5, um pouco diferente de como ocorreu nas outras purificações, cujas purezas mais altas foram encontradas nas parcelas terminadas por _2 e _3. Este comportamento observado na P4 não é esperado e uma possível explicação para o ocorrido foi a dificuldade de eluição da proteína de interesse nas subfrações iniciais da eluição central em razão da perda de controle de algum parâmetro durante o

fracionamento, que fez com que a eluição da PspA4Pro só acontecesse com maior intensidade a partir da subfração Q250_3.

Tabela 9 – Resultados da P4. Biomassa obtida no cultivo 3, conduzido em meio definido, com indução por IPTG 0,7 mmol.L⁻¹. Purificação realizada com protocolo de Benedini (2019).

Fração	Massa de proteínas totais (g)	Pureza da PspA4Pro (%)	Massa de PspA4Pro (g)	Fator de purificação global	Rendimento global (%)
Clarificado	10,671	38,76	4,136	1,00	100,00
QNAbs	5,555	0,00	0,000	0,00	0,00
Q100	0,720	48,40	0,349	1,25	8,43
Q250_2	0,267	36,66	0,098	0,95	2,36
Q250_3	0,320	75,33	0,241	1,94	5,83
Q250_4	0,326	89,14	0,290	2,30	7,02
Q250_5	0,049	77,36	0,038	2,00	0,91
Q250_6	0,032	74,51	0,024	1,92	0,57
Q250_7	0,024	65,93	0,016	1,70	0,38
Q250_8	0,016	68,12	0,011	1,76	0,26
Q250_9	0,013	64,13	0,008	1,65	0,19
Q250_10	0,012	9,79	0,001	0,25	0,03
Q1000	1,122	18,10	0,203	0,47	4,91

Em razão da amostra do pool Q250 da P4 ter sido descartada, foi feita a média das purezas das subfrações utilizadas da Q250, resultando em 62,33%, com fator de purificação global de 1,61 e rendimento global de 17,5%.

4.2.6. Purificação 5

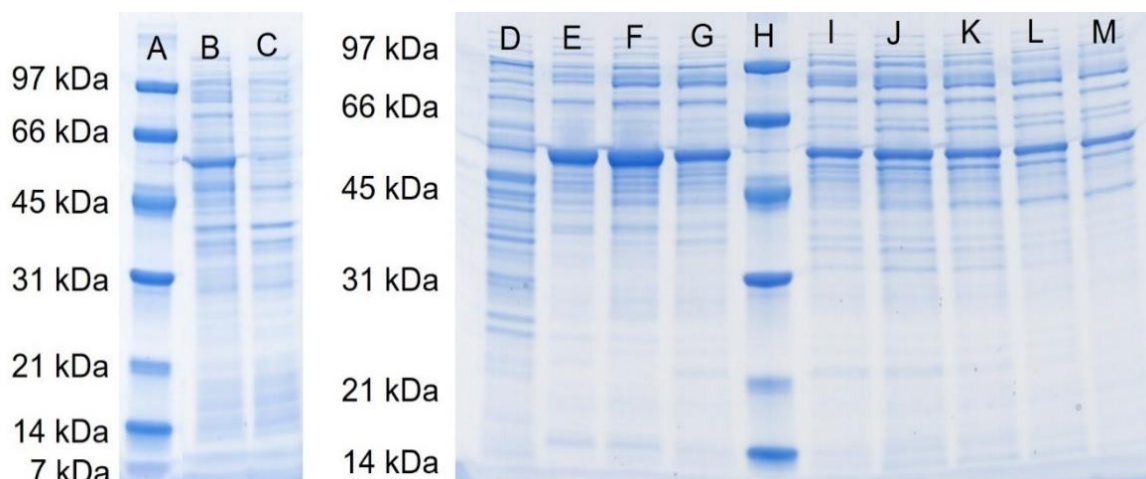
Conforme mostra a Tabela 4 (Materiais e Métodos) e está descrito em 3.2.1.3, P5 foi realizada seguindo o protocolo proposto por Figueiredo (2014) a partir do mesmo clarificado celular utilizado na P4. O principal objetivo nesta purificação foi estudar a influência do uso de protocolos de eluição diferentes no desempenho do processo, por meio da comparação dos resultados com os da P4.

A Tabela 10 apresenta os resultados de massa de proteínas totais, pureza e massa de PspA4Pro, fator de purificação e rendimento das frações da P5. As purezas foram estimadas com base nas imagens dos géis mostradas nas Figuras 20 e 21.

A análise dos resultados de balanço de massa será realizada de forma conjunta para as seis purificações em 4.3.1, tanto para a etapa de cromatografia de troca aniônica quanto para a crioprecipitação.

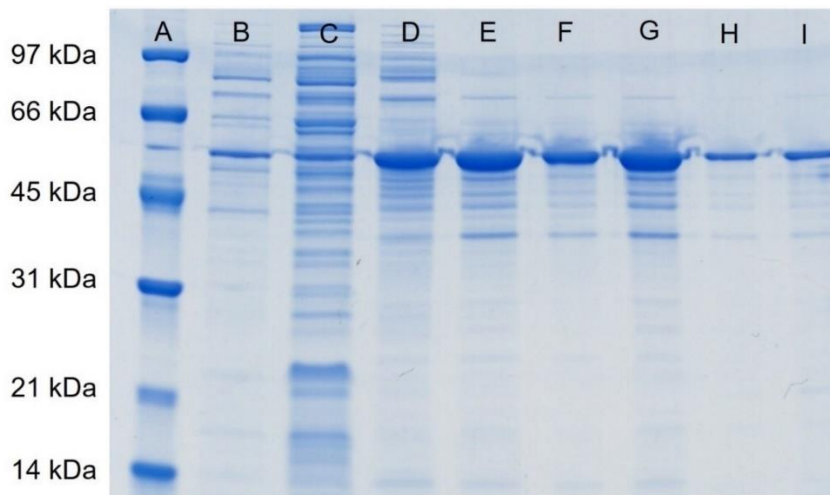
Não foi feita a eletroforese das amostras Q300_1 e Q300_6 a Q300_10 após a crioprecipitação, em razão de ter sido obtido um baixo valor em massa de proteínas solúveis totais pelo método BCA.

Figura 20 – Frações da purificação P5 em dois géis 12% SDS-PAGE. A) Marcador molecular. B) Clarificado. C) QNAds. D) Q150. E) Q300_2. F) Q300_3. G) Q300_4. H) Marcador molecular. I) Q300_5. J) Q300_6. K) Q300_7. L) Q300_8. M) Q300_9.



Fonte: Autor.

Figura 21 – Frações da purificação P5 no gel 12% SDS-PAGE. A) Marcador molecular. B) Q300_10. C) Q1000. D) Pool. E) Pool após a crioprecipitação. F) Q300_2 após a crioprecipitação. G) Q300_3 após a crioprecipitação. H) Q300_4 após a crioprecipitação. I) Q300_5 após a crioprecipitação.



Fonte: Autor.

Realizando uma análise geral dos resultados de pureza obtidos para as subfrações da eluição central e da eluição Q150 na P5, foi percebido que os valores estiveram muito abaixo dos encontrados nas purificações anteriores, o que pode ser justificado em parte pela baixa pureza do clarificado, igual a apenas 29,80%. Além disso, foi levantada a hipótese de que a resina contida na coluna cromatográfica já tivesse atingido a sua vida útil, o que pode ter diminuído a eficiência da coluna. Portanto, para a realização da próxima purificação (P6), foi decidido empacotar a coluna com uma nova resina Q-Sepharose.

A pureza na fração Q1000 foi de apenas 12,19%, o que era previsto em razão da maior parte da proteína de interesse já ter eluído nas subfrações anteriores, havendo pouca quantidade dela para ser eluída com o uso da concentração de 1000 mmol.L⁻¹ de NaCl.

Conforme era esperado, as maiores purezas foram atingidas nas duas primeiras subfrações da eluição central, Q300_2 e Q300_3, sendo iguais a 46,47% e 47,60%, respectivamente. Os resultados para o fator de purificação global nessas subfrações foram de apenas 1,20 para a Q300_2 e 1,23 para a Q300_3, com baixos rendimentos globais, que não chegaram a 5%.

Tabela 10 – Resultados da P5. Biomassa obtida no cultivo 3, conduzido em meio definido, com indução por IPTG 0,7 mmol.L⁻¹. Purificação realizada com protocolo de Figueiredo (2014).

Fração	Massa de proteínas totais (g)	Pureza da PspA4Pro (%)	Massa de PspA4Pro (g)	Fator de purificação global	Rendimento global (%)
Clarificado	4,249	29,80%	1,266	1,00	100%
QNAds	2,555	12,80%	0,327	0,33	7,91%
Q150	0,725	11,83%	0,086	0,31	2,07%
Q300_2	0,322	46,47%	0,150	1,20	3,62%
Q300_3	0,202	47,60%	0,096	1,23	2,33%
Q300_4	0,095	32,66%	0,031	0,84	0,75%
Q300_5	0,041	32,00%	0,013	0,83	0,32%
Q300_6	0,020	26,68%	0,005	0,69	0,13%
Q300_7	0,017	29,21%	0,005	0,75	0,12%
Q300_8	0,013	30,89%	0,004	0,80	0,10%
Q300_9	0,011	32,67%	0,004	0,84	0,09%
Q300_10	0,009	33,35%	0,003	0,86	0,07%
Q1000	0,548	12,19%	0,067	0,31	1,62%
Pool	1,163	53,97%	0,628	1,39	15,17%
Pool Crio.	0,671	72,24%	0,485	1,86	11,72%
Q300_2 Crio.	0,210	85,71%	0,180	2,21	4,36%
Q300_3 Crio.	0,108	72,95%	0,078	1,88	1,90%
Q300_4 Crio.	0,110	86,35%	0,095	2,23	2,30%
Q300_5 Crio.	0,021	71,67%	0,015	1,85	0,36%

Foi percebido que a crioprecipitação elevou a pureza de todas as frações nas

quais foi aplicado este procedimento, tanto para o pool formado da eluição central quanto para as subfrações Q300_2 a Q300_5. Foram calculados o fator de purificação e o rendimento referentes à etapa de crioprecipitação para todos os materiais mencionados. A Tabela 11 reúne todos os resultados.

Com base nos dados da Tabela 11, foi possível classificar a crioprecipitação como reprodutível para as subfrações da eluição central, sendo um procedimento interessante para elevar as purezas, uma vez que foram obtidos altos valores de fator de purificação para a etapa. Além disso, a maior parte da massa de PspA4Pro foi recuperada nas subfrações, de acordo com os altos valores de rendimento, que se aproximaram de 100% nas subfrações Q300_2, Q300_3 e Q300_5. O pool formado da eluição Q300 também teve bons resultados, tendo sido obtida uma pureza 1,34 vezes maior em relação ao material inicial, com 77,26% da massa de PspA4Pro recuperada.

Tabela 11 – Dados da crioprecipitação para a P5.

Fração	Pureza antes da Crio. (%)	Pureza depois da Crio. (%)	FP _{crio}	R _{crio} (%)
Pool	53,97%	72,24%	1,34	77,26
Q300_2	46,47%	85,71%	1,84	≅100,00
Q300_3	47,60%	72,95%	1,53	81,25
Q300_4	32,66%	86,35%	2,64	≅100,00
Q300_5	32,00%	71,67%	2,24	≅100,00

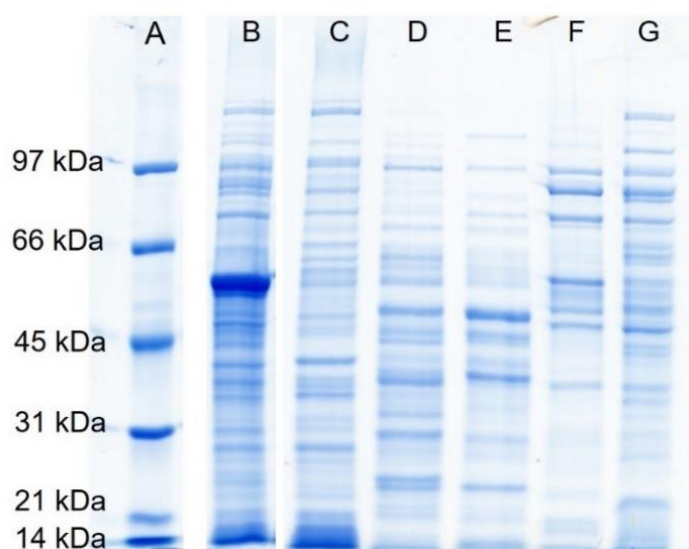
Baseando-se nos resultados apresentados na Tabela 11, foi decidido realizar a crioprecipitação individual das subfrações da eluição central também na purificação posterior (P6), a qual foi executada com o uso da biomassa detendo o maior rendimento em PspA4Pro, 175 mg PspA4Pro/g células, aumentando as chances de atingimento da pureza de 95% para a PspA4Pro, com o uso do protocolo de Benedini (2019).

4.2.7. Purificação 6

Conforme mostra a Tabela 4 (Materiais e Métodos) e está descrito em 3.2.1.3, P6 foi executada adotando o protocolo proposto por Benedini (2019) a partir do mesmo clarificado celular utilizado na P1. Foi decidido utilizar o material mencionado em razão de no cultivo da biomassa em questão ter sido obtido um elevado rendimento em PspA4Pro, igual a 175 mg PspA4Pro/g células, havendo maior expectativa de se atingir a pureza de 95% desejada para a proteína de interesse utilizando o protocolo de Benedini (2019). Nesta purificação, foi feita a correção da elevação da temperatura durante o rompimento celular e, também, a crioprecipitação das subfrações individuais da eluição central.

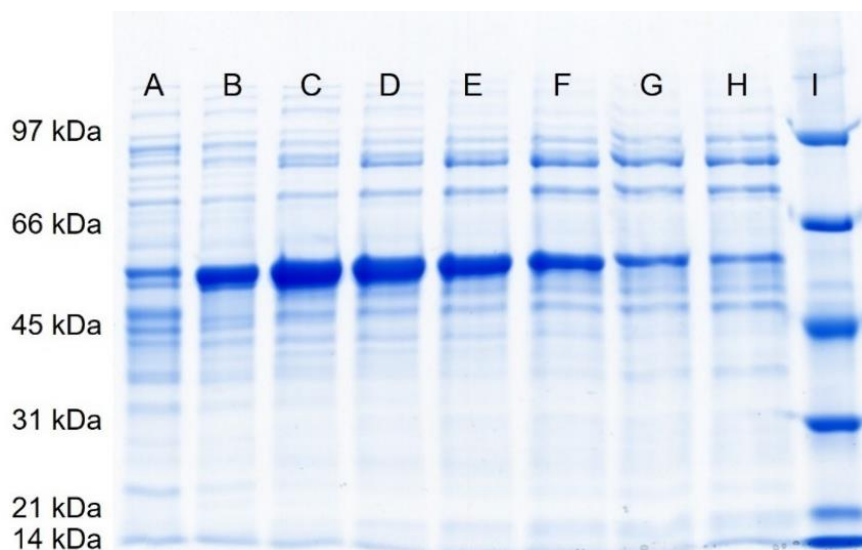
A Tabela 12 apresenta os dados de massa de proteínas totais, pureza e massa de PspA4Pro, fator de purificação e rendimento das frações da P6. As purezas foram estimadas com base nas imagens dos géis mostradas nas Figuras 22 a 25. Para o pool representativo da eluição central, foi feita a média das purezas estimadas nas amostras B da Figura 24 e C da Figura 25.

Figura 22 – Frações da purificação P6 no gel SDS-PAGE. A) Marcador molecular. B) Clarificado. C) QNAds. D) Q100. E) Q250_1. F) Q250_10. G) Q1000.



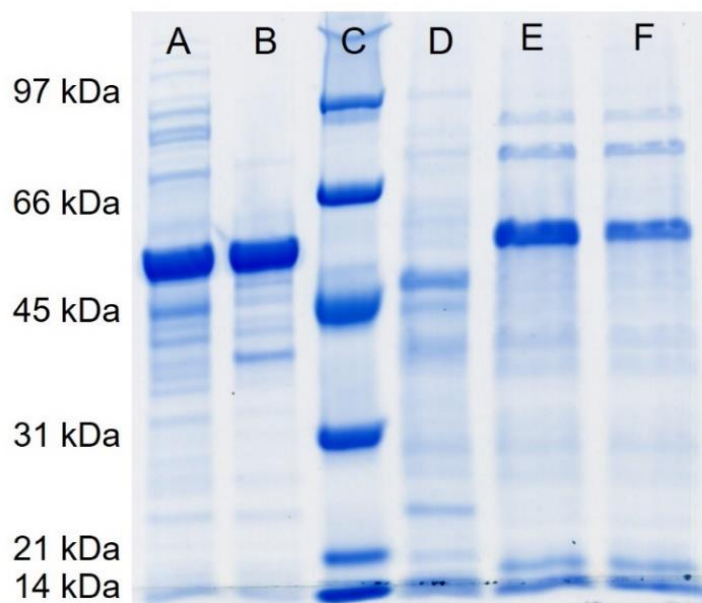
Fonte: Autor.

Figura 23 – Frações da purificação P6 no gel SDS-PAGE. A) Q250_2. B) Q250_3. C) Q250_4. D) Q250_5. E) Q250_6. F) Q250_7. G) Q250_8. H) Q250_9. I) Marcador molecular.



Fonte: Autor.

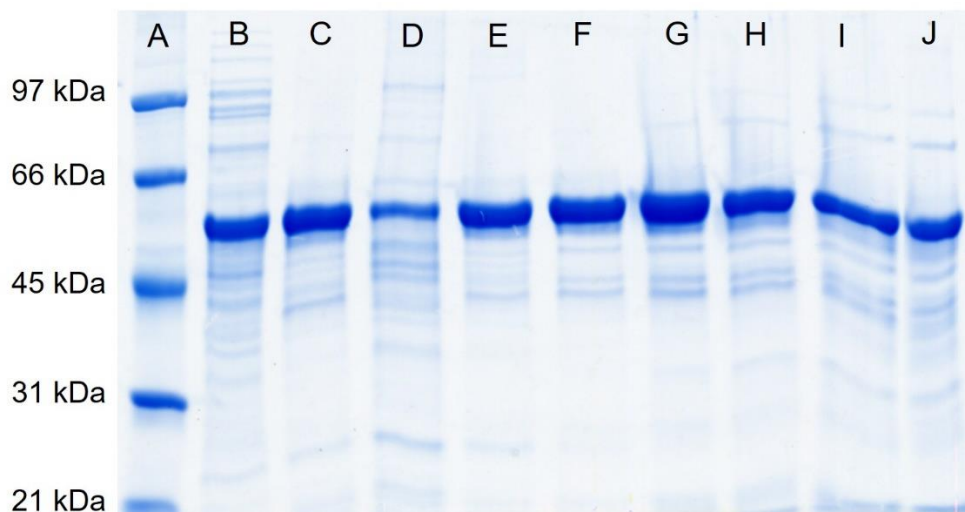
Figura 24 – Frações da purificação P6 no gel SDS-PAGE. A) Pool. B) Pool após a crioprecipitação. C) Marcador molecular. D) Q250_1 após a crioprecipitação. E) Q250_9 após a crioprecipitação. F) Q250_10 após a crioprecipitação.



Fonte: Autor.

Figura 25 – Frações da purificação P6 no gel SDS-PAGE. A) Marcador molecular. B) Pool.

C) Pool após a crioprecipitação. D) Q250_2 após a crioprecipitação. E) Q250_3 após a crioprecipitação. F) Q250_4 após a crioprecipitação. G) Q250_5 após a crioprecipitação. H) Q250_6 após a crioprecipitação. I) Q250_7 após a crioprecipitação. J) Q250_8 após a crioprecipitação.



Fonte: Autor.

Fazendo uma análise dos dados da Tabela 11, foi possível verificar que o empacotamento da coluna com uma nova resina corrigiu o problema evidenciado na purificação anterior, tendo sido obtidas purezas mais elevadas nas subfrações da eluição central.

A pureza na fração Q100, de apenas 5,60%, pode ter sido mais baixa devido às fortes interações entre a molécula-alvo e a resina na coluna, dificultando a eluição com o uso de uma concentração mais baixa de NaCl, de 100 mmol.L⁻¹. A pureza observada na fração Q1000 foi de somente 3,30%, o que era esperado devido à maior parte da proteína de interesse já ter eluído nas subfrações anteriores, havendo pouca quantidade dela para ser eluída com o uso da concentração de 1000 mmol.L⁻¹ de NaCl.

Conforme era esperado, as purezas mais elevadas foram encontradas nas subfrações iniciais da eluição central, neste caso, 77,20% em Q250_3 e 80,40% em Q250_4. Nas subfrações citadas, também foram obtidos os maiores valores de fator de purificação (1,88 em Q250_3 e 1,96 em Q250_4) e rendimento (26,76% em Q250_3 e 11,01% em Q250_4) globais.

Tabela 12 – Resultados da P6. Biomassa obtida no cultivo 2, conduzido em meio complexo, com indução por IPTG 0,7 mmol.L⁻¹. Purificação realizada com protocolo de Benedini (2019).

Fração	Massa de proteínas totais (g)	Pureza da PspA4Pro (%)	Massa de PspA4Pro (g)	Fator de purificação global	Rendimento global (%)
Clarificado	4,180	41,00	0,919	1,00	100,00
QNAbs	0,762	0,00	0,000	0,00	0,00
Q100	0,251	5,60	0,014	0,14	1,53
Q250_1	0,003	4,10	<0,001	0,10	0,01
Q250_2	0,120	19,30	0,023	0,47	2,52
Q250_3	0,318	77,20	0,246	1,88	26,76
Q250_4	0,126	80,40	0,101	1,96	11,01
Q250_5	0,061	76,30	0,046	1,86	5,05
Q250_6	0,034	68,00	0,023	1,66	2,52
Q250_7	0,019	57,60	0,011	1,40	1,21
Q250_8	0,012	47,50	0,005	1,16	0,60
Q250_9	0,010	20,40	0,002	0,50	0,22
Q250_10	0,008	14,40	0,001	0,35	0,13
Q1000	0,181	3,30	0,006	0,08	0,65
Pool	0,233	69,50	0,162	1,70	17,59

A Tabela 13 expõe os resultados referentes ao processo de crioprecipitação aplicado às subfrações da eluição central e ao pool Q250.

De acordo com os dados da Tabela 13, a crioprecipitação elevou as purezas de todos os materiais analisados, com exceção da subfração Q250_1, devido à quantidade mínima em massa de PspA4Pro presente nessa amostra, que não foi

detectada no gel SDS-PAGE após a crioprecipitação.

Tabela 13 – Dados da crioprecipitação para a P6.

Fração	Pureza antes da Crio. (%)	Pureza depois da Crio. (%)	FP _{crio}	R _{crio} (%)
Pool	69,50	87,25	1,26	64,35
Q250_1	4,10	0,00	0,00	0,00
Q250_2	19,30	59,10	3,06	89,70
Q250_3	77,20	96,00	1,24	43,58
Q250_4	80,40	95,10	1,18	52,81
Q250_5	76,30	93,70	1,23	48,07
Q250_6	68,00	91,10	1,34	43,18
Q250_7	57,60	79,50	1,38	38,78
Q250_8	47,50	78,60	1,65	33,02
Q250_9	20,40	63,50	3,11	67,76
Q250_10	14,40	59,10	4,10	45,43

Foi visível a obtenção de purezas acima de 95% nas subfrações Q250_3 e Q250_4, atingindo o objetivo principal da P6.

A maior desvantagem observada no método da crioprecipitação das subfrações individuais foi a obtenção de rendimentos mais baixos em PspA4Pro, ficando abaixo de 50% em sete das dez amostras. Isto indica que o atingimento de uma pureza mais elevada da proteína de interesse pode ocasionar maior perda em massa após a crioprecipitação. Isso também pode estar relacionado com o uso de volumes menores na crioprecipitação das subfrações individuais, sendo recomendável um estudo específico das condições de crioprecipitação das subfrações.

4.3. Análise comparada dos resultados das purificações

4.3.1. Balanço de massa

Nas seis purificações realizadas, foi feito o balanço de massa na etapa de cromatografia de troca aniônica, tanto para as proteínas solúveis totais quanto para a PspA4Pro. Conforme foi explicado em 3.4, a massa de entrada na coluna cromatográfica corresponde ao clarificado, enquanto a massa de saída é equivalente ao somatório das massas das frações e subfrações de eluição. A Tabela 14 apresenta as massas de proteínas solúveis totais observadas na entrada e na saída da coluna cromatográfica nas seis purificações, juntamente com a diferença calculada no balanço de massa para cada uma.

Analisando os dados da Tabela 14, é visível, nas purificações 1, 2, 5 e 6 a diferença mínima no balanço de massa, a qual pode ser atribuída aos erros experimentais do método BCA, que incluem a realização de várias pipetagens, tanto dos reagentes quanto das amostras, a variação da absorbância com o tempo, a sensibilidade dos reagentes à luz, a oscilação da absorvidade específica para diferentes proteínas e a dependência da temperatura de incubação das amostras.

Já na P3 e na P4, foram observados mais de 2,00 g a menos na saída da coluna cromatográfica se o valor for comparado com o da massa de proteínas solúveis totais medida para o clarificado. Entre os fatores que podem ter motivado a diferença registrada, cita-se a possibilidade da interferência de impurezas como DNA, RNA, polissacarídeos, lipídeos e lipopolissacarídeos no método BCA.

A Tabela 15 mostra, de maneira similar à exibida na Tabela 14, os dados referentes à PspA4Pro.

Fazendo o estudo dos dados da Tabela 15, as diferenças no balanço de massa para a PspA4Pro são mais visíveis na P3 e na P4 e estão claramente associadas às divergências no balanço de massa observadas para as proteínas solúveis totais nessas purificações.

Tabela 14 – Balanço de massa de proteínas solúveis totais nas cromatografias.

Purificação	Massa de entrada (g)	Massa de saída (g)	Diferença no balanço de massa (g)
P1	2,993	3,029	0,036
P2	2,428	2,623	0,195
P3	7,099	4,653	2,446
P4	10,671	8,458	2,213
P5	4,249	4,547	0,298
P6	1,663	1,907	0,244

Tabela 15 – Balanço de massa da PspA4Pro nas cromatografias.

Purificação	Massa de entrada (g)	Massa de saída (g)	Diferença no balanço de massa (g)
P1	1,760	0,969	0,791
P2	0,691	0,476	0,215
P3	3,312	0,824	2,488
P4	4,136	1,277	2,859
P5	1,266	0,791	0,475
P6	0,531	0,480	0,051

Também foi feito o balanço de massa para a etapa de crioprecipitação nas purificações 1, 2, 3, 5 e 6 tanto para as proteínas solúveis totais quanto para a PspA4Pro. Para isso, foi feita a análise das amostras do pool de cada purificação após a crioprecipitação e as massas obtidas foram comparadas com a massa inicial do pool, correspondente ao somatório das massas registradas das subfrações da eluição central. Os resultados estão apresentados na Tabela 16 e na Tabela 17. O procedimento descrito não foi feito para a P4, pelo fato das alíquotas coletadas depois da crioprecipitação terem sido comprometidas. Nas subfrações individuais da eluição

central da P5 e da P6, foi priorizado o estudo da recuperação em massa de PspA4Pro após a crioprecipitação, cuja discussão já foi detalhada nos tópicos 4.2.5 e 4.2.6.

Tabela 16 – Balanço de massa de proteínas solúveis totais após a crioprecipitação de cada pool representativo da eluição central.

Purificação	Massa do pool inicial (g)	Massa do pool após a crioprecipitação (g)	Diferença no balanço de massa (g)
P1	0,934	1,161	0,227
P2	0,868	0,881	0,013
P3	0,973	0,878	0,095
P5	1,163	0,671	0,492
P6	0,233	0,119	0,114

Discutindo os resultados da Tabela 16, compreendeu-se que a crioprecipitação permitiu a recuperação de, pelo menos, mais de 51% da massa de proteínas solúveis totais. No caso da P1 e da P2, a massa do pool medida após a crioprecipitação foi um pouco maior se comparada à massa do pool inicial, podendo isso ser relacionado com as incertezas experimentais do método BCA, já mencionadas anteriormente.

Qualitativamente, é possível dizer que toda a massa de proteínas solúveis totais foi recuperada após a etapa de crioprecipitação nas purificações 1 e 2. Com relação à P3, foi recuperada 90,24% da massa de proteínas solúveis totais depois da crioprecipitação, indicando baixa perda em massa. Na P5 e na P6, foi recuperada, respectivamente, 57,70% e 51,07% da massa de proteínas solúveis totais após a crioprecipitação. A maior perda em massa nessas duas purificações pode ser atribuída ao uso de um menor volume de trabalho para a formação do pool representativo da eluição central, o qual foi de apenas 100 mL em cada uma, podendo ter ocasionado a crioprecipitação de uma parte das proteínas totais nas amostras.

Tabela 17 – Balanço de massa da PspA4Pro após a crioprecipitação de cada pool representativo da eluição central.

Purificação	Massa do pool inicial (g)	Massa do pool após a crioprecipitação (g)	Diferença no balanço de massa (g)
P1	0,723	1,022	0,299
P2	0,394	0,678	0,284
P3	0,824	0,839	0,015
P5	0,628	0,485	0,143
P6	0,162	0,104	0,058

Analisando os dados da Tabela 17, foi possível entender que a crioprecipitação permitiu a recuperação de 100% em massa da PspA4Pro quando o pool representativo foi formado pelo volume total das subfrações da eluição. Na P1, na P2 e na P3, a massa de PspA4Pro contida no pool após a crioprecipitação foi um pouco maior em relação à massa do pool inicial. Essa observação pode ser justificada pelo fato de não ter sido incluída a massa de PspA4Pro das subfrações não analisadas no ensaio SDS-PAGE no somatório da massa total do pool inicial, devido ao baixo valor medido da massa de proteínas solúveis totais nessas subfrações. Em contrapartida, o pool destinado à crioprecipitação foi composto por todas as dez subfrações da eluição central nas três purificações. Além disso, também é presente o erro experimental associado a densitometria de bandas, o qual pode ter influenciado nos valores de pureza medidos.

Na P5 e na P6, foi recuperada, respectivamente, 77,23% e 64,20% da massa de PspA4Pro após a crioprecipitação, o que também pode estar relacionado ao menor volume de trabalho utilizado para formar o pool representativo da eluição central nessas duas purificações, igual a 100 mL, podendo ter ocasionado a crioprecipitação de uma pequena quantidade de PspA4Pro.

4.3.2. Cromatografia de troca aniônica

A Tabela 18 apresenta os principais dados das seis purificações realizadas e do trabalho de Cardoso *et al.* (2022). De acordo com os dados da tabela citada, a pureza do pool da eluição central foi semelhante nas seis purificações realizadas.

O rendimento em PspA4Pro da biomassa utilizada na P1 foi de 175 mg PspA4Pro/g células. Conforme a Tabela 12 indica, a pureza de PspA4Pro encontrada no clarificado foi de 58,8%. Esse resultado foi comparado com a pureza do clarificado de 56,8% obtida no trabalho de Cardoso *et al.* (2022), no qual o rendimento em PspA4Pro tinha sido de 145 mg PspA4Pro/g células. Conforme tinha sido esperado, a pureza do clarificado na P1 foi maior.

Comparando os clarificados da P1 e da P2, apesar do prejuízo causado pelo aumento da temperatura na lise celular, os dados de pureza foram coerentes, pois era esperado a pureza do clarificado ser menor na P2 em razão do rendimento em PspA4Pro ter sido 152 mg PspA4Pro/g células, menor comparado ao dado na P1, 175 mg PspA4Pro/g células. Devido à similaridade dos resultados do pool da eluição central na P1 e na P2 e aos problemas de aumento da temperatura durante a lise celular nessas purificações, não foi possível avaliar a influência do meio de cultivo no desempenho do processo.

A pureza do clarificado da P3, 46,7%, foi coerente se comparada com a do trabalho de Cardoso *et al.* (2022), 56,8%, devido ao rendimento em PspA4Pro na biomassa utilizada na obtenção do clarificado celular processado na P3, 100 mg PspA4Pro/g células, ser menor em relação ao da biomassa utilizada na purificação de Cardoso *et al.* (2022), 145 mg PspA4Pro/g células.

A pureza do clarificado da P3 foi maior do que a da P2, 28,5%, a qual teve um rendimento em PspA4Pro maior, de 152 mg PspA4Pro/g células. Essa observação é mais uma evidência do prejuízo causado à P2 pela elevação da temperatura no momento da ruptura celular, principalmente, na pureza do clarificado.

Logo na fração do clarificado da P4, foi possível perceber a melhora do processo em relação à P2, pois foi obtida a massa de proteínas totais de 10,671 g, muito maior comparada à anterior, de apenas 2,428 g. Isso confirma a ocorrência da desnaturação de proteínas na P2, devido à alta temperatura.

Tabela 18 – Comparação das cromatografias com a de Cardoso *et al.* (2022).

Processo	Condições de cultivo	$Y_{PspA4Pro/X}$ (mg PspA4Pro/g células)	Pureza do clarificado (%)	Resultados do pool da eluição central
Purificação 1	Batelada, meio complexo, IPTG ($0,7 \text{ mmol.L}^{-1}$)	175	58,8	Q250: Pureza = 62,9% $FP_{global} = 1,07$ $R_{global} = 41,1\%$
Purificação 2	Batelada, meio definido, IPTG ($0,7 \text{ mmol.L}^{-1}$)	152	28,5	Q250: Pureza = 57,8% $FP_{global} = 2,07$ $R_{global} \cong 100\%$
Purificação 3	Batelada, meio complexo, IPTG ($1,0 \text{ mmol.L}^{-1}$)	100	46,7	Q300: Pureza = 65,6% $FP_{global} = 1,41$ $R_{global} = 24,9\%$
Purificação 4	Batelada, meio definido, IPTG ($0,7 \text{ mmol.L}^{-1}$)	152	38,8	Q250: Pureza = 62,3% $FP_{global} = 1,61$ $R_{global} = 17,5\%$
Purificação 5	Batelada, meio definido, IPTG ($0,7 \text{ mmol.L}^{-1}$)	152	29,8	Q300: Pureza = 54,0% $FP_{global} = 1,39$ $R_{global} = 15,2\%$
Purificação 6	Batelada, meio complexo, IPTG ($0,7 \text{ mmol.L}^{-1}$)	175	41,1	Q250: Pureza = 69,5% $FP_{global} = 1,70$ $R_{global} = 17,6\%$
Cardoso <i>et al.</i> (2022)	Batelada, meio definido, IPTG ($0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$), lactose 10 g/L	145	56,8	Q300: Pureza = 78,3% $FP_{global} = 1,38$ $R_{global} = 27,4\%$

O resultado da pureza do clarificado da P4, 38,8%, também foi melhor do que o da P2, de 28,5%, mas ainda foi inferior ao esperado, devido ao alto rendimento em PspA4Pro da biomassa, de 152 mg PspA4Pro/g células, maior em relação ao da P3 e do trabalho de Cardoso *et al.* (2022). Essa observação pode indicar a inexatidão da determinação da pureza da PspA4Pro pela densitometria de bandas ou a perda de massa da proteína de interesse no processo. Foi percebido, de forma geral, um aumento das purezas de todas as subfrações da eluição central, quando é feita a comparação da P4 com a P2.

Avaliando os resultados de pureza do clarificado da P5 e da P6, ambos também foram abaixo do esperado, o que pode ser justificado pelas mesmas razões apresentadas a respeito do valor mais baixo de pureza do clarificado observado na P4. Entretanto, principalmente na P4 e na P6, foi possível atingir bons resultados de pureza para a proteína de interesse nas primeiras subfrações da eluição central, mesmo a partir de um clarificado com pureza mais baixa.

Foi observada muita variação na pureza do clarificado para suspensões preparadas com as mesmas biomassas, como foi o caso da P1 e da P6 e, também, da P2, P4 e P5. Entre as razões que podem justificar essa diferença, é possível incluir a falta de homogeneidade nos pellets congelados e o erro da densitometria de bandas.

Os resultados da eluição central da P3 foram investigados em conjunto com os de Cardoso *et al.* (2022). Ambas as biomassas foram purificadas utilizando o protocolo de eluição de Figueiredo (2014), porém, foram obtidas com o uso de meios de cultivo diferentes. A pureza média da fração Q300 na P3 foi menor comparada com a do trabalho citado, tendo fator de purificação e rendimento globais semelhantes. Com base nisso, não é possível dizer que o uso de meios de cultivo diferentes influenciou na purificações, porque era esperado um valor mais baixo da pureza do pool Q300 na P3, em razão da menor pureza do material de partida.

Comparando o resultado da eluição central da P4 com o de Cardoso *et al.* (2022), tendo ambas as purificações sido feitas com biomassas em meio definido e protocolos de eluição diferentes, a pureza do pool Q250 da P4, 62,3%, foi inferior à do pool Q300 de Cardoso *et al.* (2022), 78,3%. O fator de purificação, 1,73, foi maior comparado ao de Cardoso *et al.* (2022), 1,61, e o rendimento, 17,5%, foi menor em relação ao do trabalho citado, 27,4%. Os motivos que podem ter influenciado no

melhor resultado obtido por Cardoso *et al.* (2022) incluem o menor tempo de armazenamento da biomassa empregada na purificação, o uso de diferentes homogeneizadores de alta pressão nessas purificações e, também, de distintos métodos de quantificação de proteínas solúveis totais, tendo sido utilizado o método de Lowry na purificação de Cardoso *et al.* (2022) e o método BCA na P4.

Não é possível afirmar com certeza a respeito da influência do protocolo de eluição no desempenho do processo de purificação utilizando a comparação da P4 com a purificação feita por Cardoso *et al.* (2022). Isso se deve às diferenças na metodologia utilizada em cada trabalho, como o uso de diferentes biomassas, apesar de ambas terem sido obtidas por meio de cultivos conduzidos em meio definido, a utilização de distintos homogeneizadores de alta pressão e a adoção de diferentes técnicas de quantificação de proteínas solúveis totais, como já foi dito anteriormente. Além disso, a biomassa utilizada no trabalho de Cardoso *et al.* (2022) ficou armazenada por aproximadamente 1 ano antes de ser purificada, enquanto as biomassas usadas no presente trabalho ficaram armazenadas entre 4 e 5 anos antes das purificações serem realizadas. Isto pode estar relacionado com as diferenças nos resultados dessa purificação com a de Cardoso *et al.* (2022).

A pureza mais baixa no pool da P4 também pode ser explicada, em parte ou totalmente, pelo valor mais baixo de pureza do material de partida, que pode ter sido decorrente do alto tempo de armazenamento da biomassa da P4, como já foi mencionado. Foi decidido não realizar a comparação entre a P4 e a P5, em razão da resina utilizada na coluna cromatográfica já ter ultrapassado a sua vida útil, principalmente no momento de execução da P5, na qual houve maior prejuízo nos resultados da purificação.

Foi feita a análise em conjunto dos resultados da P4 e da P6 para realizar um estudo adicional sobre a influência do uso de biomassas de meios de cultivo diferentes no desempenho da purificação. Ambas as biomassas foram purificadas com o uso do protocolo de eluição de Benedini (2019), porém, foram obtidas a partir de meios de cultivo distintos.

Foi perceptível que a pureza do clarificado da P6, 41,1%, foi ligeiramente superior à pureza do clarificado da P4, 38,8%, portanto, as purezas do pool obtidas em cada purificação foram condizentes, pois era esperada a pureza do pool da P6, 69,5%, ser um pouco maior se comparada à da P4, 62,3%. O fator de purificação e o

rendimento globais encontrados nas duas purificações foram similares.

Desta maneira, a comparação entre a P4 e a P6 confirmou a conclusão feita na análise comparativa entre a P3 e a purificação de Cardoso *et al.* (2022), ou seja, o meio de cultivo não teve influência nos resultados das purificações. Este resultado é muito bom, pois indica que o processo de purificação consegue lidar com diferenças no material de partida.

Por fim, foram confrontados os dados da P3 e da P6, que se trataram de purificações feitas com biomassas obtidas em meio complexo e com o uso de protocolos de eluição diferentes. A pureza do pool obtida na P6, 69,5%, foi maior com relação ao mesmo resultado encontrado na P3, 65,6%. O fator de purificação global atingido na P6, 1,70, também foi maior se comparado ao mesmo dado na P3, 1,41. Apenas o rendimento global calculado para o pool da P6, 17,6%, foi menor que o da P3, 24,9%. Com base nas informações apresentadas, é possível dizer que o protocolo de Benedini (2019), de modo geral, foi mais eficiente se comparado ao de Figueiredo (2014).

4.3.3. Crioprecipitação

A Tabela 19 apresenta os resultados da crioprecipitação feita nas purificações 1, 2 e 3 e do trabalho de Cardoso *et al.* (2022).

As purificações 1, 2, 3, 5 e 6 tiveram valores parecidos de fator de purificação da crioprecipitação que, inclusive, se assemelharam ao do trabalho de Cardoso *et al.* (2022). Isto indica a excelente reprodutibilidade da crioprecipitação, sendo possível aumentar a pureza do pool em até, aproximadamente, 1,5 vezes.

Com relação aos dados de rendimento da crioprecipitação, foi possível notar a recuperação de quase ou toda a massa de PspA4Pro nas purificações 1 a 3 e na purificação do trabalho de Cardoso *et al.* (2022).

Apenas na P5 e na P6 o rendimento em PspA4Pro após a crioprecipitação foi menos elevado, podendo esta observação ser justificada, conforme foi explicado em 4.3.1, pelo menor volume usado na preparação do pool da eluição central, equivalente a 100 mL, o que pode ter ocasionado a precipitação de uma pequena quantidade em massa da PspA4Pro.

Tabela 19 – Comparação das crioprecipitações com a de Cardoso *et al.* (2022).

Processo	Condições de cultivo	Resultados do pool pós-crioprecipitação
Purificação 1	Batelada, meio complexo, IPTG (0,7 mmol.L ⁻¹)	Q250: Pureza = 88,1% FP _{crio.} = 1,40 R _{crio.} ≅ 100%
Purificação 2	Batelada, meio definido, IPTG (0,7 mmol.L ⁻¹)	Q250: Pureza = 77,0% FP _{crio.} = 1,33 R _{crio.} ≅ 100%
Purificação 3	Batelada, meio complexo, IPTG (1,0 mmol.L ⁻¹)	Q300: Pureza = 95,5% FP _{crio.} = 1,46 R _{crio.} ≅ 100%
Purificação 5	Batelada, meio definido, IPTG (0,7 mmol.L ⁻¹)	Q300: Pureza = 72,2% FP _{crio.} = 1,34 R _{crio.} = 77,3%
Purificação 6	Batelada, meio complexo, IPTG (0,7 mmol.L ⁻¹)	Q250: Pureza = 87,3% FP _{crio.} = 1,26 R _{crio.} = 64,4%
Cardoso <i>et al.</i> (2022)	Batelada, meio definido, IPTG (0,5 mmol.L ⁻¹), lactose 10 g/L	Q300: Pureza = 98,3% FP _{crio.} = 1,30 R _{crio.} = 90,0%

5 CONCLUSÃO

Com base na metodologia desenvolvida e nos resultados obtidos neste trabalho, foi possível compreender que elevadas purezas podem ser obtidas para a PspA4Pro mesmo a partir de clarificados celulares com purezas mais baixas. Purezas acima de 95% podem ser atingidas por meio da combinação do uso do protocolo de eluição de Benedini (2019) para a cromatografia de troca aniônica com o fracionamento da eluição feita com a concentração intermediária de NaCl, acrescentando-se, ainda, um procedimento de crioprecipitação às subfrações iniciais da eluição mencionada. Contudo, a obtenção de purezas mais elevadas da proteína de interesse ocorrerá com rendimentos em massa mais baixos.

O uso de biomassas obtidas em meios de cultivo diferentes (definido ou complexo) não influencia demasiadamente nos resultados finais das purificações.

O modelo desenvolvido por Benedini (2019) descreve de forma adequada a cromatografia de troca aniônica para clarificados celulares de ClearColi®. O protocolo de eluição de Benedini (2019) foi mais eficiente se comparado ao protocolo de eluição de Figueiredo (2014), conforme era esperado pela modelagem e simulação de Benedini (2019), na qual foi formado um pico mais amplo para a proteína de interesse no perfil de eluição quando a concentração de NaCl na eluição central foi igualada a 250 mmol.L⁻¹, ao passo que o pico referente à PspA4Pro foi mais estreito quando a concentração de NaCl na eluição central foi igual a 300 mmol.L⁻¹.

Como sugestões para trabalhos futuros, é possível citar a utilização dos resultados da P6 na simulação do perfil de cromatografia de troca aniônica e comparação com os dados experimentais obtidos para a avaliação do modelo com os dados das subfrações coletadas. Também é recomendável a realização de uma análise econômica para a definição da estratégia mais apropriada para a obtenção da pureza final desejada em PspA4Pro (> 95%) a partir do subfracionamento da eluição central associada à crioprecipitação das subfrações, como alternativa à etapa de cromatografia de troca catiônica, contabilizando-se as vantagens e as desvantagens do uso de cada estratégia como a etapa posterior à cromatografia de troca aniônica. Por fim, também seria interessante executar um estudo específico da crioprecipitação das subfrações iniciais da eluição na qual foi utilizada a concentração intermediária de NaCl.

REFERÊNCIAS

AMERSHAM-PHARMACIA BIOTECH AB. **Ion exchange chromatography: principles and methods**. 1999.

APELSETH, T. O. *et al.* **Plasma and cryoprecipitate for transfusion**. Rossi's Principles of Transfusion Medicine. John Wiley & Sons Ltd., 6 ed., 2022.

ARNAU, J. *et al.* Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. **Protein Expression and Purification**, v. 48, p. 1-13, 2006.

AZMED. **Tezspire**. Disponível em: https://www.azmed.com.br/content/dam/multi-brand/br/pt/azmed-2022/home/bulas-profissionais/bulas/Tezspire_Bula_Profissional.pdf. Acesso em 09 mai. 2024.

BANKI, M. R. *et al.* Novel and economical purification of recombinant proteins: internet-mediated protein purification using in vivo polyhydroxybutyrate (PHB) matrix association. **Protein Science**, v. 14, p.1387-1395, 2005.

BARAZZONE, G. C. *et al.* Production and purification of recombinant fragment of pneumococcal surface protein A (PspA) in *Escherichia coli*. **Procedia in Vaccinology**, v. 4, p. 27-35, 2011.

BELL, M. R. *et al.* To fuse or not to fuse: what is your purpose? **Protein Science**, v. 22, p. 1466-1477, 2013.

BENEDINI, L. J. *et al.* Modeling and simulation of anion exchange chromatography for purification of proteins in complex mixtures. **Journal of Chromatography A**, v. 1613, 2020.

BENEDINI, L. J. **Modelagem e otimização da cromatografia de troca aniônica no processo de produção de proteína de pneumococo**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2019.

CABERGS. **Cartilha sobre asma**. Disponível em: https://www.cabergs.org.br/arquivos/cartilha_asma_af.pdf. Acesso em 09 mai. 2024.

CARDOSO, V. M. **Produção de proteína recombinante de superfície A de pneumococo em *Escherichia coli*: análise econômica e influência da plataforma de expressão**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2019.

CARDOSO, V. M. *et al.* ClearColi as a platform for untagged pneumococcal surface protein A production: cultivation strategy, bioreactor culture, and purification. **Applied Microbiology and Technology**, v. 106, p. 1011-1029, 2022.

CARVALHO, B. M. A. *et al.* Steric mass action model for lactoferrin adsorption in cryogel with immobilized copper ions. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 33, n. 1, p. 215-223, 2016.

CHEN, T.; XU, W. A purification method for tag-free human cystatin C recombinant protein expressed in *Escherichia coli*. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 47, n. 2, p. 123-128, 2017.

CHI, E. Y. *et al.* Roles of conformational stability and colloidal stability in the aggregation of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. **Protein Science**, v. 12, iss. 5, p. 893-1140, 2003.

CHO, S. C. *et al.* Enhancement of lipid extraction from marine microalga, *Scenedesmus* associated with high-pressure homogenization process. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p. 1-6, 2012.

CIOLA, R. **Fundamentos da cromatografia líquida de alto desempenho**, São Paulo: Blucher, 1998.

CLEARCOLI. **ClearColi Technology**. Disponível em: <https://clearcoli.com/technology/>. Acesso em 23 out. 2022.

CLOSE, E. *et al.* Modelling of industrial biopharmaceutical multicomponent chromatography. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 92, n. 7, p. 1304-1314, 2014.

COLLINS, C. H. *et al.* **Fundamentos de cromatografia**. 2006.

DONAT, R. *et al.* Gradient design for liquid chromatography using multi-scale optimization. **Journal of Chromatography**, v. 1535, p. 32, 2018.

EGUIA, F. A. P. *et al.* Development of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (nartograstim) production process in *Escherichia coli* compatible with industrial scale and with no antibiotics in the culture medium. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, p. 169-183, 2021.

FIGUEIREDO, D. B. *et al.* Production and purification of an untagged pneumococcal surface protein A (PspA4Pro) with high purity and low endotoxin content. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, p. 2305-2317, 2017.

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

FINETTE, G. M. S. *et al.* Comparative studies on the isothermal characteristics of proteins adsorbed under batch equilibrium conditions to ion-exchange, immobilised metal ion affinity and dye affinity matrices with different ionic strength and temperature conditions. **Journal of Chromatography A**, v. 763, n. 1-2, p. 71-90, 1997.

GALLAGHER, S. R. SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE). **Current Protocols Essential Laboratory Techniques**, v. 6, 7.3.1-7.3.28, 2012.

GALLANT, S. R. *et al.* Modeling non-linear elution of proteins in ion-exchange chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 702, n. 1-2, p. 125-142, 1995.

G-BIOSCIENCES. **Using Tags in Protein Purification: When Should You Use Them?** Disponível em: [https://info.gbiosciences.com/blog/bid/201325/using-tags-in-protein-purification-when-should-you-use-them#:~:text=On%20the%20other%20hand%2C%20here,may%20be%20difficult%20to%20cleave](https://info.gbiosciences.com/blog/bid/201325/using-tags-in-protein-purification-when-should-you-use-them#:~:text=On%20the%20other%20hand%2C%20here,may%20be%20difficult%20to%20cleave.). Acesso em 23 out. 2022.

GLATZ, C. E. **Precipitation. Separation Processes in Biotechnology**. New York: Marcel Dekker, p. 329-356, 1990.

GRITTI, F.; GUIOCHON, G. Calculated and experimental chromatograms for distorted gradients and non-linear solvation strength retention models. **Journal of Chromatography A**, v. 1356, p. 96-104, 2014.

GU, T. **Mathematical modeling and scale-up of liquid chromatography: With application examples**. Springer: 2015.

GUIOCHON, G. *et al.* **Fundamentals of preparative and nonlinear chromatography**. United States: Elsevier, 2006.

HAMPTON RESEARCH. **Hexadecyltrimethylammonium bromide**. Disponível em: <https://hamptonresearch.com/product-Hexadecyltrimethylammonium-bromide-184.html>. Acesso em 23 out. 2022.

HARRIS, E. L. V.; ANGAL, S. **Protein purification methods: a practical approach**. Oxford: IRL Press, 317 p., 1994.

HARRISON, R. G. **Protein purification process**. New York: Marcel Dekker, p.381, 1994.

HILBRIG, F.; FREITAG, R. Protein purification by affinity precipitation. **Journal of chromatography B**, v. 790, n. 1-2, p. 79-90, 2003.

HOLLINGSHEAD, S. K. *et al.* Diversity of PspA: mosaic genes and evidence for past recombination in *Streptococcus pneumoniae*. **Infect and Immunity**, v. 68, n. 10, p. 5889-900, 2000.

HUUK, T. C. *et al.* Model-based integrated optimization and evaluation of a multi-step ion exchange chromatography. **Separation and Purification Technology**, v. 136, p. 207-222, 2014.

JANSON, J. C. **Protein purification: principles, high resolution methods, and applications**. John Wiley & Sons, 2012.

KACZMARSKI, K., *et al.* Comparative modeling of breakthrough curves of bovine serum albumin in anion-exchange chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 925, n. 1-2, p. 1-17, 2001.

KARKOV, H. S. *et al.* Methods development in multimodal chromatography with mobile phase modifiers using the steric mass action model. **Journal of Chromatography A**, v. 1318, p. 149-155, 2013.

LI, X. *et al.* High performance production process development and scale-up of an anti-TSLP nanobody. **Protein Expression and Purification**, v. 218, 2024.

LI, X. *et al.* Capture and purification of an untagged nanobody by mixed weak cation chromatography and cation exchange chromatography. **Protein Expression and Purification**, v. 192, 2022.

LIU, W. *et al.* Recent advances in the selection and identification of antigen-specific nanobodies. **Molecular Immunology**, v. 96, p. 37-47, 2018.

LUCARINI, A. C. **Purificação da amiloglicosidase produzida por *Aspergillus awamori* NR RL 312 por precipitação com etanol**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

MADHI, S. A.; PELTON, S. I. **Epidemiology, diagnosis, and treatment of serious pneumococcal infections in children**. *Pneumococcal Vaccines*. American Society of Microbiology, p. 95-116, 2008.

MAMAT, U. *et al.* Detoxifying *Escherichia coli* for endotoxin-free production of recombinant proteins. **Microbial cell factories**, v. 14, n. 1, p. 57, 2015.

MERCK MILLIPORE. **Ultra Centrifugal Filters**. Disponível em: <https://www.merckmillipore.com/BR/pt/product/Amicon-Ultra-0.5mL-Centrifugal-Filters-for-DNA-and-Protein-Purification-and-Concentration,MM_NF-C82301>. Acesso em: 01 fev. 2024.

MCKINNON, B. T.; AVIS, K. E. Membrane Filtration of Pharmaceutical Solutions. **American Journal of Hospital Pharmacy**, v. 50, iss. 9, p.1921-1936, 1 September 1993.

MORENO, A. T. *et al.* Immunization of mice with single PspA fragments induces antibodies capable of mediating complement deposition on different pneumococcal strains and cross-protection. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 17, n. 3, p. 439-446, 2010.

NOVO NORDISK. **CTAB**. Disponível em: <https://novonordiskpharmatech.com/products/ctab/>. Acesso em 23 out. 2022.

PAREDES, S. A. H. ***Escherichia coli* detoxificada como plataforma para produção de proteína recombinante A de superfície de pneumococo**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2018.

PESSOA, A.; KILIKIAN, B. V. **Purificação de produtos biotecnológicos**. Barueri: Manole, 988 p., 2005.

PLANESSE C. *et al.* Recombinant human HSP60 produced in ClearColi™ BL21(DE3) does not activate the NFκB pathway. **Cytokine**, v. 73, n. 190-195, 2015.

PYLE, D. L. **Separations for biotechnology**. Chichester: Ellis Horwood Limited, p.502, 1990.

SCOPES, R. K. **Protein purification: principles and practice**. New York: Springer-Verlag, 1994.

SCHUBERT, P. F.; FINN, R. K. Alcohol precipitation of proteins: the relationship of denaturation and precipitation for catalase. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 23, p. 2569-2590, 1981.

SENKOVICH, O. *et al.* 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, n. 4, p. 701-713, 2007.

SMITH P. K. *et al.* Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**. v. 150, n. 1, p. 76-85, 1985.

TANAKA, H *et al.* Three types of recombinant human granulocyte colonystimulating factor have equivalent biological activities in monkeys. **Cytokine**, v.9, n.5, p. 360-369, 1997.

TEOH, H. K. *et al.* Experimental verification and optimisation of a detailed dynamic high performance liquid chromatography column model. **Computers & Chemical Engineering**, v. 25, n. 4-6, p. 893-903, 2001.

VILELA, S. M. A. *et al.* A protocol for recombinant protein quantification by densitometry. **Microbiology Open**, v. 9, iss. 6, p. 1175-1182, 2020.

WHEEWRIGHT, S. M. **Protein purification: design and scale up of downstream processing**. New York: Kohn Wiley & Sons Inc., 1994.

WHO. Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization. **The Weekly Epidemiological Record**, v. 82, n. 12, p. 93-104, 2009.

YOTHER, J.; BRILES, D. E. Structural properties and evolutionary relationships of PspA, a surface protein of *Streptococcus pneumoniae*, as revealed by sequence analysis. **Journal of Bacteriology**, v. 174, n. 2, p. 601-609, 1992.