



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA



FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**AVALIAÇÃO DO USO DE SAIS NA PRECIPITAÇÃO DE UMA PROTEÍNA
EMPREGADA COMO AGENTE ANTIVIRAL**

Uberlândia-MG, 2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA



FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**AVALIAÇÃO DO USO DE SAIS NA PRECIPITAÇÃO DE UMA PROTEÍNA
EMPREGADA COMO AGENTE ANTIVIRAL**

KAMILLA ALVES CARVALHO

Orientadora: Fabiana Regina Xavier Batista

Co-Orientadora: Miriam Maria Rezende

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Uberlândia-MG, 2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

C331a Carvalho, Kamilla Alves, 1990-
2015 Avaliação do uso de sais na precipitação de uma proteína empregada
como agente antiviral / Kamilla Alves Carvalho. - 2015.
63 f. : il.

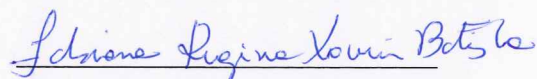
Orientador: Fabiana Regina Xavier Batista.
Coorientadora: Miriam Maria Rezende.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Química.
Inclui bibliografia.

1. Engenharia química - Teses. 2. Proteínas - Análise - Teses. 3.
Precipitação (Química) - Teses. 4. Agentes antivirais - Teses. I. Batista,
Fabiana Regina Xavier . II. Rezende, Miriam Maria. III. Universidade
Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Química. IV.
Título.

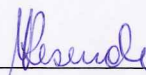
CDU: 66.0

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA COMO PARTE DOS REQUISITOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM ENGENHARIA QUÍMICA, EM 31 /07/2015.

BANCA EXAMINADORA:



Prof^ª. Dr^ª. Fabiana R. Xavier Batista
(Orientadora- PPG-EQ/UFU)



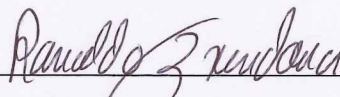
Prof^ª. Dr^ª. Miriam Maria Resende
(Co-Orientadora- PPG-EQ/UFU)



Prof^ª. Dr^ª. Erika Ohta Watanabe
(Colaboradora - PPG-EQ/UFU)



Prof. Dr. Jonny Yokosawa
(ICBIM-/UFU)



Prof. Dr. Ronaldo Z. Mendonça
(Instituto Butantan-São Paulo-SP)

Esta dissertação de mestrado é dedicada aos meus avós Letícia e Geraldo e aos meus pais Margareth e Ilton, que representam meu grande incentivo na concretização de mais esta etapa.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

A minha família, meu pai, minha mãe, minha irmã e meu irmão, sem o apoio de vocês nada disso seria possível, obrigada pelo incentivo e por sempre apoiarem as minhas decisões.

Aos meus avós que sempre me ajudaram e me incentivaram seja qual for a situação, mesmo distantes se fizeram presentes da maneira como era possível, a minha eterna gratidão.

A Profa. Dra. Fabiana Regina Xavier Batista, pela confiança e pela oportunidade de executar este trabalho.

A Profa. Dra. Erika Ohta Watanabe, de fundamental contribuição para a realização deste trabalho, grata pela atenção e pela paciência.

Ao Prof. Dr. Ronaldo Zucatelli Mendonça por ceder as amostras utilizadas para precipitação salina, bem como pela realização de testes fundamentais no Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan.

Ao Prof. Dr. Jonny Yokosowa por ceder o laboratório bem como pelo auxílio fornecido, a Thelma e Edgar sempre dispostos a auxiliar no que fosse preciso.

Às companheiras de laboratório pelos conselhos e auxílios prestados.

Sumário

RESUMO	XII
ABSTRACT	XIII
CAPÍTULO 1- INTRODUÇÃO	13
CAPÍTULO 2- OBJETIVO.....	15
CAPÍTULO 3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
3. RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS (RPB).....	16
3.1 PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS	17
3.2 PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS PELO DE USO DE SAIS.....	19
3.3 TECNOLOGIA DE CULTIVO CELULAR PARA SÍNTESE DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES	24
3.5 SARAMPO E PICORNAVÍRUS COMO PROBLEMA DE SAÚDE	29
CAPÍTULO 4 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
4.1 SISTEMA DE EXPRESSÃO DA PROTEÍNA DE INTERESSE E PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO DA PROTEÍNA TOTAL	31
4.2. DETERMINAÇÃO DA SOLUBILIDADE PROTEICA A PARTIR DO USO DE SAIS	32
4.2.1. Determinação da Solubilidade Proteica com Sulfato de Amônio e de Sódio	32
4.2.2. Determinação da Solubilidade Proteica com Carbamato de Amônio	33
4.2.3. Remoção do Sal Volátil Através de Liofilização	33
4.3. CÉLULAS E VÍRUS	34

4.4 CULTURAS DE CÉLULAS VERO E L929 <i>in vitro</i>	34
4.5. AVALIAÇÃO DO EFEITO TÓXICO DOS PRECIPITADOS PROTEICOS OBTIDOS POR AÇÃO SALINA EM CULTURAS DE CÉLULAS L929	34
4.6. AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIVIRAL	35
CAPÍTULO 5- RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1 DETERMINAÇÃO DA CURVA DE SOLUBILIDADE DA BSA EM PÓ E EM SOLUÇÃO USANDO SULFATO DE AMÔNIO.....	36
5.2 DETERMINAÇÃO DA CURVA DE SOLUBILIDADE DA BSA (EM PÓ E EM SOLUÇÃO) USANDO SULFATO DE SÓDIO	38
5.3 DETERMINAÇÃO DA CURVA DE SOLUBILIDADE DA TRIPSINA EM PÓ USANDO SAL VOLÁTIL CARBAMATO DE AMÔNIO	41
5.4 PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS CONTIDAS NO SOBRENADANTE DO LISADO BACTERIANO USANDO SAIS CONVENCIONAIS (SULFATO DE AMÔNIO E SÓDIO) E SAL VOLÁTIL (CARBAMATO DE AMÔNIO).....	42
5.5 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS PRECIPITADOS OBTIDOS COM LISADOS BACTERIANOS EM CULTURAS DE CÉLULAS L929	45
CAPÍTULO 6 – CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....	50
CAPÍTULO 7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54
APÊNDICE	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Avaliação da solubilidade ($\log S / S^\circ$) em função da força iônica I para várias proteínas em sulfato de amônio aquoso, demonstrando o efeito salting-out. Fonte: COHN 1936 apud CHANG (2008).	22
Figura 2- Etapas do estudo proposto e local de realização	31
Figura 3 - Curva de solubilidade para BSA em pó usando sulfato de amônio, sendo a concentração inicial de proteína de 10 mg/mL. Diluição (250 μL de sobrenadante/750 μL de água). .	36
Figura 4 -Curva de solubilidade do BSA em solução usando sulfato de amônio, sendo a concentração inicial de proteína de 30 mg/mL. Diluição (250 μL de sobrenadante/750 μL de água). .	Error! Bookmark not defined.
Figura 5- . Curva de solubilidade do BSA em pó em sulfato de sódio, sendo a concentração inicial de proteína de 10mg/mL. Diluição (250 μL de sobrenadante/750 μL de água) .	Error! Bookmark not defined.
Figura 6- . Curva de solubilidade do BSA em solução em sulfato de sódio, sendo a concentração inicial de proteína de 30 mg/mL. Diluição (500 μL de sobrenadante/ 500 μL de água).	38
Figura 7 - Curva de solubilidade para a tripsina suína em pó usando o sal carbamato de amônio, sendo a concentração inicial de proteína de 30 mg/mL. .	Error! Bookmark not defined.40
Figura 8- Eficiência de diferentes sais na precipitação de proteínas contidas no sobrenadante do lisado de E. coli com 95% de sal. Concentração inicial de proteína no lisado celular foi de 0,137 mg/mL. .	42

Figura 9 - Eficiência de diferentes sais na precipitação de proteínas contidas no sobrenadante do lisado de E. coli com 90% de sal. Concentração inicial de proteína no lisado celular foi de 0,137 mg/mL. 42

Figura 10- . Avaliação qualitativa da citotoxicidade em células L929 de precipitados obtidos com (A) carbamato de amônio [diluição de 8x (61,73mg/mL), 16x (30,86 mg/mL) e 32x (15,44 mg/mL)]; (B) sulfato de amônio [diluição de 32x (5,95 mg/mL), 64x (2,97 mg/mL) e 128x (1,48 mg/mL)]; (C) sulfato de sódio [diluição de 2x (78,08 mg/mL), 4x (39,04 mg/mL) e 8x (19,53 mg/mL)]. *Células com núcleo corado com cristal violeta. Controle: cultura de células L929 sem adição de precipitados..... 45

Figura 11- Avaliação do efeito antiviral do precipitado do lisado bacteriano obtido com (CA) carbamato de amônio (24,7mg/mL); (SA) sulfato de amônio (1,90 mg/mL) e (SS) sulfato de sódio (15,61 mg/mL). Controle (CC): cultura de células L929 mantidas em meio L15. À esquerda constam as diluições em série aplicadas ao vírus EMC que inicialmente apresentou título viral de 103 TCID50/mL e diluição na razão 2. 47

Figura 12- Avaliação do efeito protetor de precipitados salinos em culturas de células Vero inoculadas com vírus do sarampo. (A) carbamato de amônio 8x; (B) sulfato de amônio 8x e (C) sulfato de sódio 4x. As células foram coradas com cristal violeta (0,4% m/v). (D) Controle: cultura de células Vero não inoculadas e (E) cultura de células Vero inoculada com o vírus do sarampo na diluição de razão 2. O título viral inicial do vírus do sarampo foi de 102 TCID50/mL. 49

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- Valores da constante Ks da Equação de Cohn para BSA em pó.....	40
TABELA 2- Valores da constante Ks da Equação de Cohn para BSA em solução	40
TABELA 3 - Diluições aplicadas para a curva de calibração do micro ensaio.....	52
TABELA 4 - Diluições aplicadas para a curva de calibração do macro ensaio.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AVLO- Proteína de ação antiviral encontrada na hemolinfa da lagarta *L. obliqua*;

BSA- Albumina soro bovino;

β – Constante dependente do pH, da temperatura e da proteína;

Células L929 – Linhagem de células de fibroblasto de camundongo – *Mus musculus*;

Células Sf9- Linhagem de células de inseto da lagarta *Spodoptera frugiperda*;

EMC- Vírus da encefalomiocardite de camundongo.

Ks- Constante de *salting-out* específica da proteína e do sal (mg/mL)⁻¹;

L. obliqua- Espécie de lagarta *Lonomia obliqua* cuja hemolinfa apresenta compostos antivirais;

m- Concentração de sal (mg/mL);

PBS- Tampão fosfato salino;

PEG-Polietileno glicol;

pI- Ponto isoelétrico;

RecAVLOEc- Recombinante Antiviral de *L. obliqua* expressa em *E. coli*;

RPB- Recuperação e Purificação de biomoléculas;

SFB- Soro fetal bovino;

2D- PAGE- eletroforese em gel em duas dimensões.

RESUMO

Proteínas recombinantes, expressas em culturas celulares, têm se mostrado importantes na produção de fármacos de interesse para a saúde humana. Insulina, interferons e a vacina contra a hepatite B são exemplos de produtos obtidos a partir de sistemas recombinantes de expressão. A precipitação é uma técnica amplamente empregada para separação de proteínas a partir de uma mistura devido à sua simplicidade, sendo tal fato potencializado pelo uso de sais. Este estudo, inicialmente, abordou a validação do método de precipitação salina das proteínas puras BSA e tripsina e em adição a investigação do processo de precipitação da proteína recAVLOEc, sintetizada por células de *E. coli BL21 (DE3) pLysS* utilizadas como sistema de expressão. Tal proteína é originalmente encontrada na hemolinfa da lagarta *Lonomia obliqua*. A precipitação foi conduzida por meio do uso de sais convencionais (sulfato de amônio e de sódio) e do sal volátil carbamato de amônio. As células bacterianas foram ressuspensas em tampão fosfato e submetidas à lise mecânica. No procedimento experimental estabelecido, o contato de um concentrado proteico com uma solução salina saturada (sulfato de amônio, sulfato de sódio ou carbamato de amônio) foi mantido por 24 horas a 5°C. O sobrenadante foi isolado do precipitado por meio de centrifugação e estas frações tiveram sua concentração proteica determinada através do método de Bradford. O precipitado proteico obtido do lisado bacteriano foi então administrado em culturas de células L929 e Vero para a avaliação do efeito citotóxico e posteriormente para a verificação da ação antiviral para o EMC e o sarampo. Os resultados demonstraram maior eficiência do sulfato de sódio na precipitação da BSA quando comparado ao sulfato de amônio. Enquanto que para a tripsina o carbamato de amônio foi mais efetivo. Um efeito tóxico em culturas de L929 foi observado para os precipitados obtidos pelo uso de sulfato de amônio e de sódio. Entretanto, como esperado, o precipitado proteico obtido pelo uso do sal volátil carbamato de amônio apresentou menor efeito citotóxico. Os testes em culturas de L929 infectadas com o vírus EMC foram efetuados e as amostras de proteínas precipitadas com os sais convencionais e o sal volátil não resultaram em ação antiviral. Em culturas de células Vero, o uso do sulfato de sódio como agente de precipitação das proteínas contidas no lisado bacteriano resultou em ação antiviral para o sarampo.

ABSTRACT

Recombinant proteins expressed in cell culture have been shown to be relevant in the biopharmaceutical production focusing human healths. Insulin, interferon and vaccine against B hepatitis are products obtained from recombinant expression system. Importantly, the precipitation is a widely used technique for separating proteins from a mixture due to its simplicity, and the process is incremented by the use of salts. This study initially dealt with the validation of the salt precipitation method by using the purified BSA and trypsin, and then, to investigate the precipitation process of recAVLOEc protein synthesized by cells of *E. coli* BL21 (DE3) *pLysS* used as expression system for the AVLO. This protein has shown antiviral activity and it found in the hemolymph of *Lonoimia obliqua* caterpillar. The precipitation was conducted by the use of conventional salts (ammonium sulfate and sodium sulfate) and the volatile salt ammonium carbamate. The proteins of the bacterial expression system were evaluated for their antiviral potential virus-infected cell cultures. Bacterial cells were resuspended in phosphate buffer and lysate by ultrasound. In the experimental procedure, the saturated salt solution (ammonium sulfate, sodium sulfate or ammonium carbamate) was added dropwise to the protein solution. This mixture was kept at constant temperature of 5°C for 24 h. The supernatant phase was separated from the precipitate phase by centrifugation. The protein precipitate obtained from bacterial lysate was then added to cultures of L929 and Vero cells to evaluate the cytotoxic effect; and cultures of these cells were subsequently infected with virus (EMC and measles). The results showed better efficiency of sodium sulfate on the precipitation of BSA compared to ammonium sulfate, while for trypsin, the ammonium carbamate showed more effective. Toxic effect on the culture of L929 cells was observed for the precipitate obtained by the use of ammonium sulfate and sodium sulfate. However, as expected, the precipitated protein obtained by the use of volatile ammonium carbamate salt showed a lower cytotoxic effect. Tests in L929 cultures infected with EMC, were performed; however, protein samples obtained by conventional and volatile salts used as a precipitating agent did not show antiviral action. In Vero cell cultures, the precipitated protein from cell lysate by sodium sulfate showed antiviral action for measles.

CAPÍTULO 1- INTRODUÇÃO

O uso de sais como agentes de precipitação e, por conseguinte, responsáveis pela recuperação de proteínas de uso terapêutico ou diagnóstico tem se mostrado uma alternativa atraente ao emprego de membranas ou ainda solventes orgânicos, metodologias estas recorrentes em técnicas de Recuperação e Purificação de Biomoléculas (RPB).

Embora eficiente, a utilização de sais como o sulfato de amônio ou de sódio pode ocasionar perdas parciais da atividade biológica da proteína precipitada, uma vez que segundo a série de Hofmeister (PESSOA e KILIKIAN, 2005) a eficiência na precipitação é inversamente proporcional à ação desnaturante causada pelo íon salino utilizado. Além disso, ao final do processo obtém-se um precipitado contendo o sal utilizado, o que inviabiliza o uso direto da proteína concentrada como fármaco ativo.

É neste contexto que o uso de sais voláteis como agente de precipitação se destaca. Entretanto, poucos são os trabalhos disponíveis na literatura que abordam o tema proposto (PEREIRA *et al.* 2008, WATANABE *et al.*, 2006; POPOVA *et al.*, 2008; WATANABE *et al.*, 2010, DA SILVA *et al.*, 2010) e seu detalhamento, bem como, o entendimento mais aprofundado do processo de recuperação proteica que envolva a manutenção das características biológicas das proteínas estudadas.

É importante salientar que este trabalho dá continuidade a estudos previamente realizados no Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan (SP), que apresentaram como foco principal o desenvolvimento de plataformas tecnológicas visando à produção e à avaliação de proteínas com ação antiviral. Enquanto GRECO (2009) avaliou o potencial inibidor de diferentes frações de hemolinfa bruta da lagarta *L. obliqua* na replicação dos vírus da Influenza, da poliomielite e o do sarampo, CARMO *et al.* (2012) promoveram a expressão estável de algumas proteínas existentes nesta hemolinfa usando o sistema de expressão baculovírus/células de inseto (Sf9) para verificar sua ação contra vírus da EMC (vírus da encefalomiocardite de camundongo).

De forma complementar, SILVA (2014) utilizou um sistema de expressão bacteriano como uma alternativa mais simples e viável na obtenção desta proteína que demonstrou atividade antiviral importante em testes realizados com os vírus da herpes, EMC e rubéola. Na oportunidade, métodos cromatográficos foram aplicados para realizar a purificação proteica requerida.

Assim, este estudo vislumbrou proporcionar a recuperação da proteína recAVLOEc produzida em um sistema procarionte de expressão (*E. coli* Bl21 DE3 *pLysS*), com o uso de sais. A recuperação proteica (concentração) foi realizada em único estágio com o objetivo de reduzir perdas e minimizar a sua desnaturação. Com isso, um processo alternativo para recuperação das proteínas foi estabelecido, além da avaliação *in vitro* dos produtos proteicos obtidos em culturas de células L929 inoculadas com o vírus EMC e de células Vero inoculadas com vírus do sarampo (cepa Edmonston).

CAPÍTULO 2- OBJETIVO

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar a eficiência do uso de sais na recuperação de proteínas obtidas por um sistema procarionte de expressão. Inseridos neste objetivo global estão os seguintes objetivos específicos:

- Padronizar o processo de precipitação proteica (BSA e tripsina) pelo uso de sais convencionais (sulfatos de amônio e de sódio) e de um sal volátil (carbamato de amônio);
- Avaliar o efeito dos sais convencionais e do sal volátil na precipitação de proteínas contidas no lisado celular oriundo de um sistema de expressão bacteriano;
- Avaliar o potencial antiviral da proteína recAVLOEc precipitada em culturas de células L929 e Vero inoculadas com os vírus da EMC e do sarampo, respectivamente.

CAPÍTULO 3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3. RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS (RPB)

A síntese proteica, com o uso da tecnologia do DNA recombinante, tem se mostrado recorrente na última década. Este processo pode envolver o isolamento de um gene que codifica uma proteína com potencial terapêutico e a introdução desse gene dentro de uma linhagem celular animal, bacteriana ou ainda de leveduras. Esta tecnologia viabiliza e incrementa a produção de inúmeras proteínas, que originalmente são sintetizadas em quantidades insuficientes aquela requerida para a elaboração de fármacos ou mesmo na constituição de *kits* de diagnóstico. Contudo, uma vez produzidas, estas proteínas devem passar por procedimentos de purificação que em geral mostram-se dispendiosos e muitas vezes influenciam negativamente na atividade biológica destas proteínas. É importante salientar que os processos de purificação e recuperação de proteínas heterólogas são similares, independentemente do método de produção destas proteínas. Além disso, estes métodos são responsáveis por mais de 85% dos custos totais envolvidos na produção de fármacos (TWYMAN *et al*, 2003). Assim, a definição do número de etapas e a eficiência de cada etapa utilizada se mostrarão imprescindíveis para o sucesso do procedimento de *downstream*.

Os produtos biotecnológicos apresentam uma etapa de purificação complexa, uma vez que algumas características do meio como a elevada proporção de água, a presença de seus constituintes (moléculas orgânicas e inorgânicas), metabólitos intracelulares provenientes de células mortas aumentam a influência de fatores que dificultam a obtenção da pureza requerida da molécula de interesse expressas intracelularmente, (PESSOA e KILIKIAN, 2005). É importante comentar também que para produtos intracelulares uma operação unitária adicional, dedicada ao rompimento celular, é requerida. Normalmente, isso ocorre após a etapa de clarificação (remoção de sólidos suspensos), ocasionando o aumento da viscosidade no meio.

De forma complementar, a RPB faz uso de etapas bem definidas como a preparação e clarificação da solução proteica, a purificação preliminar ou de baixa resolução (concentração proteica), a purificação de alta resolução (etapas cromatográficas) e o tratamento final (condicionamento e armazenagem). Em vista dos custos associados e ao fato de que sistemas biológicos normalmente apresentam elevada condição de diluição, a concentração de biomoléculas (proteínas) visando a redução do volume a ser processado se destaca; e dentre os métodos de concentração convencionais, a precipitação proteica tem se mostrado uma metodologia vastamente explorada.

3.1 PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS

Segundo ROTHSTEIN (1994) *apud* YOSHIKAWA *et al.* (2012), a precipitação e a cristalização de proteínas pelo uso de aditivos mostram-se como recursos fundamentais tanto na área de pesquisa, quanto em processos de purificação. Em muitos casos, tais metodologias representam etapas preliminares quando comparadas a outras operações unitárias de RPB.

As moléculas quando submetidas à precipitação se tornam insolúveis em relação ao meio em que se encontram, pois uma perturbação local pode ocasionar a redução das forças atrativas entre o soluto e o solvente. Outra justificativa para a precipitação refere-se à alteração no meio que pode acarretar o aumento da atração entre as moléculas de soluto que irão se agregar de forma mais intensa e com isso gerar a formação de um precipitado (PESSOA e KILIKIAN, 2005). Interações não covalentes como as de van der Waals e as eletrostáticas são comumente observadas quando se trata das relações entre soluto e solvente. As forças de van der Waals são mais fracas e verificadas principalmente em compostos apolares ou zonas da molécula com características apolares. Por outro lado, as interações eletrostáticas são mais intensas e típicas entre moléculas polares.

A distribuição de cargas na estrutura da molécula proteica determina a ocorrência ou não das interações mencionadas, sendo possível, por exemplo, manipulá-la por meio de alterações no pH. O valor desta variável em que se observa um equilíbrio entre o número de cargas positivas e negativas dos aminoácidos da proteína é definido como ponto isoeletrico (pI) e

corresponde ao ponto de solubilidade mínima da proteína em questão (REMIÃO *et al.*, 2003). Além de alterações no pH, metodologias diversas são aplicadas na precipitação proteica entre as quais é possível citar a adição de solventes orgânicos, o uso de polímeros e de sais. Fatores como temperatura e força iônica também são extremamente importantes em um processo eficiente de concentração e redução da solubilidade das proteínas (FENNEMA *et al.*, 2010).

Os solventes orgânicos, devido à sua característica apolar, tendem a interagir com os resíduos hidrofóbicos da molécula proteica, propiciando uma desestabilização de cargas que pode resultar na precipitação. Entretanto, o principal fator responsável pela precipitação neste caso é a redução da constante dielétrica da solução, devido à adição do composto orgânico, que consequentemente neutraliza as cargas da proteína, favorecendo assim a aproximação entre as moléculas de soluto e resultando na formação do precipitado.

CROWELL *et al.* (2013) utilizaram em seu trabalho a acetona como solvente orgânico e agente de precipitação de proteínas solúveis. Em geral, a utilização isolada de solventes orgânicos apresenta como desvantagem alterações na estrutura da proteína levando à perda da atividade da amostra. Neste caso, os autores sugeriram a combinação de dois agentes precipitantes na tentativa de evitar esta perda em decorrência de desnaturação. À acetona foi adicionado um sal neutro (NaCl) que baseado em um sistema de emparelhamento de íons, resultou efetivamente na otimização do processo de recuperação proteica.

A aplicação de um álcool como um solvente orgânico de ação precipitante também é muito recorrente na literatura e foi descrita por TSCHELIESSNIG *et al.* (2014) na purificação de anticorpos do plasma sanguíneo. Para tal, o plasma foi submetido ao procedimento usando etanol a frio. A título de comparação, os autores também adicionaram CaCl_2 com o intuito de otimizar a purificação e obter resultados mais promissores.

A utilização de polímeros solúveis em água para precipitação proteica tem como principal referência o polietileno glicol (PEG), sendo que tal polímero é neutro e estabiliza a proteína. Os polímeros usados nesta operação unitária, em geral, apresentam elevada massa molecular. Outros materiais aplicáveis são os polieletrólitos que carregados com carga oposta à da proteína atraem as moléculas. Em vista disso, a condição de operação deve ser diferente do pI (ponto isoelétrico) da amostra proteica de interesse.

Em muitas situações, moléculas proteicas de diferentes tamanhos e massas moleculares precisam ser isoladas. É o caso da recuperação dos intermediários de anticorpos recombinantes abordada em trabalho desenvolvido por SOMMER *et al.* (2015), em que uma combinação de precipitação por diferentes técnicas (polietileno glicol, ácido caprílico, cloreto de cálcio e etanol a frio) foi adotada em etapas subsequentes que se caracterizam como precipitação fracionada.

A purificação de proteínas via precipitação apresenta inúmeras vantagens de operação, como a possibilidade de operação em processo contínuo e a utilização de equipamentos simples e de baixo custo. É neste contexto que se destaca o uso de sais, uma técnica clássica, que foi inicialmente relatada por Hofmeister em 1888, sendo aplicada atualmente em diversos segmentos da indústria como uma ferramenta de concentração e purificação.

3.2 PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS PELO DE USO DE SAIS.

A precipitação de proteínas por sais é prática frequente no caso de peptídeos que se encontram em solução e ocorre pela neutralização de cargas superficiais da proteína e redução da camada de hidratação (PESSOA e KILIKAN, 2005). A aplicação de proteínas purificadas via precipitação é muito ampla tanto na área farmacêutica como na alimentícia. No trabalho desenvolvido por KARACA *et al.* (2011), algumas proteínas presentes na canola, linhaça e no soro de leite bovino foram isoladas utilizando duas metodologias distintas, a precipitação salina utilizando NaCl e a precipitação isoelétrica. Os resultados demonstraram que propriedades como a atividade interfacial e a estabilidade das proteínas isoladas usando sal eram mais elevadas quando comparadas com aquelas proporcionadas pela outra metodologia adotada.

Quando a precipitação se dá por altas concentrações de sais, o procedimento é denominado *salting - out* e neste caso a proteína sofre desidratação por ação salina. Ainda de acordo com PESSOA e KILIKIAN (2005), o efeito é mais evidente em soluções aquosas. A diminuição da solubilidade é verificada em virtude do aumento da força iônica da solução, quando consideramos que a hidratação estabiliza os íons em solução. A elevada concentração

de sal atua para reduzir a quantidade de moléculas de água disponíveis e segundo CHANG (2008), o efeito deste mecanismo de precipitação é mais perceptível em moléculas de proteína devido à grande área superficial destas moléculas, tornando sua solubilidade sensível a alterações na força iônica do meio.

O sal em solução empregado durante os procedimentos de precipitação proteica atua como um eletrólito, que segundo ATKINS e JONES (2010) mostra-se como uma substância que forma íons em solução, sendo, portanto, capaz de conduzir eletricidade. A atuação de íons em solução, bem como a descrição física de seu desempenho em meio aquoso, foi inicialmente relatada por Debye e Hückel em 1923, conforme mencionado por CHANG (2008). Os autores relacionaram conceitos como o coeficiente de atividade média da solução e força iônica. Em seu trabalho estes investigadores realizaram proposições nas quais consideraram que os eletrólitos dissociam-se completamente em íons quando estão em solução. As soluções podem ser consideradas diluídas quando se apresentam em uma concentração menor ou igual a 0,01 mol/L e os íons são, em geral, envoltos por cargas opostas formando uma atmosfera iônica.

Os conceitos acima possibilitaram o cálculo do potencial elétrico médio de cada íon em solução. O coeficiente de atividade global do eletrólito foi então descrito conforme expressão abaixo, conhecida como lei limite de Debye- Hückel (Eq. 1):

$$\log \gamma_{\pm} = \frac{1,824 \times 10^6}{(\epsilon T)^{3/2}} |z_+ z_-| \sqrt{I} \quad (1)$$

Na qual, γ_{\pm} representa o coeficiente de atividade média, ϵ a constante dielétrica do meio e z_+ e z_- as cargas dos íons e I a força iônica da solução, sendo T é a temperatura.

Adaptações feitas na Equação 1 permitem relacionar a solubilidade com a força iônica, sendo muito útil tal correlação quando se faz necessária a análise da força iônica que deve ser empregada para reduzir a solubilidade de um dado composto (Equação 2).

$$\log \frac{S}{S_0} = 0,509 |z_+ z_-| \sqrt{I} - K' I \quad (2)$$

Na Equação 2, S é a solubilidade aparente, S° é a solubilidade termodinâmica em mol/L e K' é uma constante positiva cujo valor depende da natureza do soluto e do eletrólito presente. Cohn (1925), por meio da Equação 3, realizou algumas simplificações na lei Debye- Hücke que permitiram a representação efetiva do comportamento destes compostos. Na Equação 3, β' é uma constante que representa a solubilidade da proteína quando I é zero e Ks é a constante do *salting-out*, sendo que C_{sal} representa a concentração do sal.

$$\log S = \beta' - K_s C_{sal} \quad (3)$$

As solubilidades relativas de algumas proteínas são bem específicas, de modo que, existem faixas de valores para a força iônica nas quais se observa a redução significativa de solubilidade, que se mostra interessante em processos de separação e purificação. Por esta razão, segundo CHANG (2008), em uma mistura com várias proteínas pode-se obter uma precipitação seletiva apenas se alterando a força iônica do sistema. Outra maneira de aperfeiçoar o procedimento de precipitação é pelo uso do eletrólito mais adequado.

Sabe-se que o sulfato de amônio em função da sua elevada solubilidade permite o aparecimento de forças iônicas intensas, sendo um dos agentes precipitantes mais utilizados (PRATA e SGARBIERI, 2005). A Figura 1 apresenta um perfil de solubilidade de cinco proteínas quando na presença de sulfato de amônio como agente de precipitação. O que se observa na Figura 1 é que cada proteína apresenta uma faixa restrita de força iônica na qual se verifica a redução da solubilidade. Dentre as amostras apresentadas, apenas a hemoglobina e a pseudoglobulina mostram um comportamento similar com valores comuns de solubilidade para uma mesma força iônica. As demais sofrem o efeito da redução de solubilidade sob valores distintos de força iônica. Esta característica possibilita o emprego de sais na precipitação seletiva, ou seja, adotando variações na força iônica é possível precipitar

diferentes proteínas, fato que tem relação com a estrutura molecular de cada uma das amostras proteicas avaliadas.

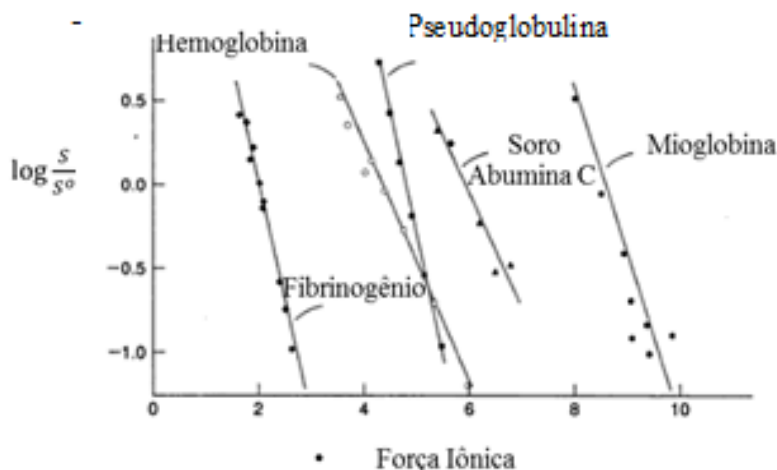


Figura 1. Avaliação da solubilidade ($\log S / S^0$) em função da força iônica I para várias proteínas em sulfato de amônio aquoso, demonstrando o efeito *salting-out*. Fonte: COHN 1936 *apud* CHANG (2008).

Conforme relata PESSOA e KILIKIAN (2005), a eficiência de diferentes íons na precipitação via *salting out*, tendo como referência sais neutros foi discutida por Hofmeister em 1888. Este autor realizou testes empíricos e descreveu a seguinte série para os ânions: $\text{SO}_4^{2-} > \text{PO}_4^{2-} > \text{CH}_3\text{COO}^- > \text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{I}^- > \text{ClO}_4^- > \text{SCN}^-$ e também para os cátions: $\text{NH}_4^+ > \text{Cs}^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+ > \text{Mg}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Ba}^{2+}$ (VOET e VOET, 2013) que estão descritos quanto a sua capacidade de redução da solubilidade.

Já os agentes caotrópicos atuam aumentando a solubilidade de compostos apolares em água. Entretanto, o efeito desnaturante é observado no rompimento das interações hidrofóbicas, cujo mecanismo de ação não é bem compreendido de acordo com VOET e VOET (2013). Os autores comentam que os seguintes íons apresentam este comportamento: I^- , ClO_4^- , SCN^- , Li^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} e Ba^{2+} . Já os íons mais efetivos quanto à precipitação via *salting-out* são chamados íons cosmotrópicos e atuam no sentido contrário, estabilizam a proteína e reforçam as forças hidrofóbicas, aumentando a tendência da água em expelir as

moléculas proteicas. Portanto, em situações em que o intuito é isolar a proteína e reaproveitá-la, o mais indicado é a utilização de sulfatos e fosfatos como agentes precipitantes.

Em pesquisa recente desenvolvida por MARIAM *et al* (2015), o sal sulfato de amônio foi aplicado na purificação de imunoglobulinas G (IgG) contra o antígeno da hepatite. O método foi associado à cromatografia de coluna *Sep Fast*, sendo que a concentração das amostras por intermédio do sal mostrou resultados relevantes no que se refere à purificação, recuperação e rendimento do processo. Na oportunidade os autores aplicaram uma solução salina saturada, característico do procedimento *salting out*. Esta estratégia é mais indicada quando a faixa de temperatura aplicável se aproxima dos 4°C, evitando assim desnaturação proteica. Por outro lado, MAHN *et al.* (2010) verificaram a precipitação com sulfato de amônio como um método para o empobrecimento de algumas proteínas abundantes no plasma sanguíneo. Com isso os autores pretendiam reduzir a concentração de proteína e aumentar a detecção por 2D-PAGE. Uma solução de sulfato de amônio saturada (razão de 40 %) foi utilizada, permitindo a redução de 39% da albumina presente no plasma.

Entretanto, é importante lembrar que o sal presente no precipitado precisa ser removido. Com isso, a proposição de uso de sais voláteis é uma alternativa viável. Para a remoção do sal neste caso é indicado o aumento da temperatura ou ainda variações na pressão de operação. Estas manipulações facilitam a volatilização e evitam posteriores tratamentos para a substância de interesse. A aplicação de sais voláteis se mostra como uma alternativa interessante, diminuindo custos, bem como minimizando a contaminação ambiental.

Os sais conhecidos como voláteis apresentam uma propriedade particular no que se refere ao comportamento em solução. Em meio aquoso estes sais se apresentam na forma molecular e iônica, entretanto na fase vapor apenas a forma molecular é encontrada, conforme descreve PRAUSNITZ *et al.*(1999) *apud* WATANABE (2004). Como exemplo de sais voláteis é possível citar o carbonato de amônio, carbamato de amônio e o bicarbonato de amônio. Tal propriedade é de grande importância em processos de separação, pois facilita o isolamento da substância de interesse do sal que foi utilizado para precipitá-la.

WATANABE *et al.*(2006) relataram a precipitação da tripsina suína utilizando o sal volátil carbamato de amônio e posteriormente a atividade enzimática da proteína foi analisada. O sal foi preparado da combinação de carbonato de amônio e hidróxido de amônio.

Os resultados demonstraram que aplicação deste sal em processos de precipitação é plenamente factível. A curva de solubilidade de tripsina a 4 °C foi determinada pela medição das composições das fases precipitado e sobrenadante. A análise mostrou que o carbamato de amônio foi capaz de induzir a precipitação da tripsina pelo processo de *salting-out*. A atividade da tripsina recuperada foi de 80%.

Conforme supracitado, a precipitação salina se mostra uma técnica promissora para a realização de procedimentos de RPB, como aqueles requeridos na recuperação de proteínas recombinantes para uso terapêutico ou diagnóstico. Por fim, é importante destacar que a utilização de proteínas recombinantes na produção de biofármacos vem crescendo nos últimos anos e segundo TANAKA e AMORIM (2014), as vendas globais neste mercado movimentaram quase 130 bilhões de dólares em 2010, valor que corresponde a cerca de 18% do total das vendas da indústria farmacêutica no mesmo ano. Neste sentido, a síntese eficiente destas proteínas se mostra algo essencial e deve ser alvo constante de desenvolvimento tecnológico, que se inicia com a adequada manutenção das culturas celulares nos quais estes sistemas de expressão estão inseridos.

3.3 TECNOLOGIA DE CULTIVO CELULAR PARA SÍNTESE DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Experimentos com cultivo de células evoluíram ao longo dos anos e atualmente são utilizados não somente para observar o comportamento celular, mas também para fins medicinais. Isso porque permite a análise da ação de um determinado agente patogênico, ou mesmo de certo medicamento, sem a necessidade de realização de testes em animais, prática esta que vem sendo cada vez mais combatida (MOLINARO, CAPUTO, AMENDOEIRA, 2010). Ainda segundo estes autores, os primeiros experimentos realizados com o cultivo de células animais datam de 1907 com Harrison, sendo que em 1912, Carrel deu continuidade aos estudos demonstrando a necessidade da troca frequente de nutrientes, possibilitando um tempo maior para a observação do sistema celular.

O emprego de culturas celulares exige a observação de alguns aspectos importantes, que se referem à origem da linhagem celular. Quando transformações genéticas nas células são efetuadas e estas células são capazes de proliferar em cultura e se manter indefinidamente elas são chamadas de imortalizadas. Tais células podem ser utilizadas, dentre outras possibilidades, em estudos de citotoxicidade e de controle de qualidade. O uso de células transformadas na produção de vacinas ainda é pequeno e segundo MOLINARO, CAPUTO e AMENDOEIRA (2010) é devido ao risco do DNA alterado ocasionar mudanças no DNA do organismo consumidor da vacina. A única célula transformada aplicada em vacinas até o momento é da linhagem Vero.

A linhagem celular Vero, oriunda do rim do macaco-verde africano e utilizada como sistema de expressão, foi desenvolvida por NAKAMURA *et al.* (1967) e desde então tem sido amplamente empregada. TAKATA *et al.* (1994) empregaram culturas de células Vero na verificação da eficácia de vacinas contra o sarampo, analisando se a quantidade de vírus presente nas doses da vacina foi suficiente para ativar resposta imunológica. Como resultado, os autores concluíram que as células Vero apresentaram suscetibilidade semelhante em relação a cepas virais ou vírus derivados de uma mesma cepa. Outro fator que também influenciava na avaliação da potência da vacina eram os protocolos seguidos para a manutenção celular. MELLES *et al.* (1999) também utilizaram células Vero para o isolamento de *Rickettsia*, agente etiológico da febre maculosa. Neste caso, a cultura mostrou-se vantajosa, uma vez que os sintomas da enfermidade foram pouco específicos e não se manifestaram claramente, representando assim uma alternativa biologicamente segura e de mais fácil identificação.

Células animais, em geral, necessitam de um suporte para adesão, garantindo assim sua propagação. Quando não aderentes, as células ficam em suspensão e tal variação de comportamento está associada a características próprias. Células de tecido sólido tendem a ser aderentes e células do sangue, por exemplo, se apresentam em suspensão (TAVARES e TAVARES, 2009). De forma complementar, o meio de cultura para células animais leva em consideração uma combinação de fatores como temperatura (37°C) e pH (6,8 a 7,8). Segundo FRESHNEY (2011), além do fornecimento de gases essenciais (oxigênio dissolvido entre 30 e 50% da saturação) e nutrientes (fontes de carbono e nitrogênio), o meio deve reunir todos os

aspectos favoráveis ao desenvolvimento da célula de interesse e, portanto, precisa ser rigorosamente controlado.

Com vista a atingir tais requisitos, o soro fetal bovino normalmente é adicionado aos meios de cultura para células animais, pois tal composto, segundo MORAES *et al.* (2008), é capaz de suprir as necessidades das células em geral. Entretanto, o seu uso vem sendo combatido por órgãos como a FDA (*Food and Drug Administration*, EUA), devido ao fato da variabilidade observada entre lotes, o risco de contaminação por agentes de difícil detecção (micoplasmas) e inclusive por aspectos relacionados à ética de uso animal. Assim, torna-se cada vez mais frequente o cultivo de meios artificiais e livres de soro (KARP, 2005). GALESI (2007), por exemplo, discorreu acerca da composição ideal de meio livre de soro para o cultivo de células de *Drosophila melanogaster* Schneider 2. A combinação de diferentes suplementos ao meio basal TC100, com destaque para a aplicação de extrato de levedura, permitiu que o soro fetal bovino fosse eliminado do meio de cultura.

Outro aspecto que pode afetar o desenvolvimento dos meios de cultura é a contaminação por agentes químicos ou biológicos (RYAN, 2008). A contaminação química pode ser causada por íons metálicos, restos de desinfetantes e até mesmo endotoxinas, entre outros fatores de maior dificuldade de identificação. Já a contaminação biológica ocorre por meio da presença de bactérias ou fungos que causam muitas vezes alterações na turbidez e no pH do meio.

Conforme apresentado por CUNHA (2008), além do uso de células animais como as de mamífero, existem diferentes sistemas de expressão de proteínas heterólogas sendo possível citar o uso de células de plantas, leveduras e bactérias. Os sistemas de expressão que utilizam bactérias e leveduras apresentam restrições quanto à síntese de proteínas que requerem mudanças pós-traducionais como glicosilação (adição de sacarídeos), acetilação (adição de um grupo acetila), fosforilação (adição de um grupo fosfato) entre outras. Células de insetos contendo baculovírus alterado geneticamente, assim como as células de mamíferos, são mais eficientes na expressão destas proteínas, pois são capazes de realizar tais modificações na complexidade requerida.

Trabalhos vêm sendo desenvolvidos visando melhorar as condições de síntese de proteínas heterólogas. No trabalho descrito por CUNHA (2008), sementes transgênicas de

soja foram utilizadas na síntese de cinco proteínas específicas e os genes aplicados foram da pró-insulina humana, Hgh, FIX, ScFvDIR83D4 e Anti-CD18. O autor discute que o processo mostrou-se viável economicamente, pois eliminou a utilização de fermentadores, além do fato de a biomassa vegetal utilizada ter menor custo associado. Entretanto, a síntese em vegetais encontra dificuldades como os baixos níveis de expressão do transgene, além do acúmulo dos polipeptídios recombinantes.

Leveduras representam um sistema de expressão muito aplicado na síntese de proteínas extracelulares, seja na indústria alimentícia ou de combustíveis. São indivíduos unicelulares, amplamente distribuídos na natureza, exigem menos umidade do que as bactérias e preferem temperaturas de 20°C a 30°C para se desenvolverem, necessitando ou não da presença de oxigênio (leveduras oxidativas e fermentativas). Além disso, meios com pH ácido favorecem seu cultivo, GAVA *et al.* (2009).

WANDERLEY (2011) relatou em seu trabalho a utilização das leveduras *Pichia pastoris* e *Kluyveromyces lactis* como sistema de expressão para a lecitina frutalina e a oncoproteína E7, de extrema importância na síntese de fármacos para o diagnóstico de câncer e alvo para o desenvolvimento de vacinas, respectivamente. Neste trabalho, o sistema se mostrou eficiente, porém com algumas limitações no que diz respeito à glicosilação devido às dificuldades no processamento de carboidratos complexos.

Já a aplicação de células de insetos inoculadas com baculovírus apresenta-se como uma oportunidade interessante para a síntese proteica. Segundo SOUZA (2006), tais células são resistentes ao estresse por metabólitos apresentando maior viabilidade em cultura do que as células de mamíferos. O autor demonstrou ainda em seu trabalho uma análise preliminar do uso de células do ducto de glândula submandibular humana como sistema de expressão para anticorpos contra o HIV-1. Os resultados se mostraram promissores, entretanto as técnicas aplicadas necessitam de alguns ajustes para evitar a geração de compostos tóxicos.

Sistemas de *Streptococcus gordonii* vem sendo usados de maneira alternativa para a expressão de uma proteína de superfície (SPEX), sendo que WARREN *et al.* (2004) conseguiram sintetizar o antígeno heterólogo BH4XCRR com sucesso por meio deste sistema. A proteína foi expressa com sua estrutura intacta, sem qualquer dano ou redução da atividade, e posteriormente purificada por meio de técnicas cromatográficas.

Neste sentido, as bactérias são capazes de expressar proteínas recombinantes em grandes quantidades, em um curto período de tempo, sendo as culturas de fácil manipulação e de baixo custo. Entretanto, a proteína de acordo com BELJELARSKYA (2002) é sintetizada em nível intracelular, sendo necessária a etapa de lise, na qual podem ser verificadas perdas que reduzem o rendimento final da proteína expressa.

Algumas metodologias podem ser adotadas para minimizar tais perdas, como por exemplo, a expressão em *Escherichia coli* a baixas temperaturas conforme relatado por KHOW e SUNTRARACHUN (2012), no intervalo compreendido entre 15°C e 23°C. Os autores observaram que nesta condição uma redução significativa da degradação da proteína expressa foi verificada. Os autores também comentaram as vantagens relacionadas à adição de cofatores específicos no meio de crescimento como forma de aumentar o rendimento e a taxa de enovelamento de proteínas solúveis.

De forma complementar, bactérias gram-negativas apresentam grandes vantagens na expressão de proteínas heterólogas como baixos custos de produção, rapidez na biossíntese e alta capacidade de replicação. CHEN *et al.* (2014) abordaram a aplicação de *Escherichia coli* como um sistema de expressão de proteínas heterólogas, sugerindo mudanças relacionadas à engenharia metabólica e visando com isso aumentar a eficiência da síntese de proteínas mais complexas. Os autores por meio de tais alterações obtiveram um aumento de 17,8 % na eficiência da expressão proteica.

Com o intuito de obter um bioativo específico de uma toxina (aBtx) devido à dificuldade de purificação do mesmo do organismo original, XU *et al.* (2015) aplicaram a técnica do gene recombinante usando *Escherichia coli*. Para tal, uma otimização adicional por meio de mutagênese sítio dirigida foi aplicada e o ativo foi obtido com atividade semelhante ao seu homólogo natural.

Já SILVA (2014) relatou a aplicação de um sistema bacteriano de expressão de uma proteína da hemolinfa de *Lonomia obliqua* que possuía atividade antiviral, capaz de reduzir o título do vírus do sarampo em 157 vezes em culturas de células, sendo considerada uma alternativa viável se comparada a outros mecanismos de expressão mais complexos como o baculovírus/células de inseto, por exemplo.

3.5 SARAMPO E PICORNAVÍRUS COMO PROBLEMA DE SAÚDE

No mundo inteiro, o sarampo atinge milhões de pessoas anualmente e segundo a Organização Mundial de Saúde mata cerca de 164.000. Até 2010, julgava-se que o sarampo havia sido erradicado no Brasil. Contudo, recentemente, a mídia impressa relatou casos da doença na região nordeste do país, além de casos importados de outros países nos quais a doença está ocorrendo. O sarampo é uma doença infecciosa considerada aguda, com complicações graves, transmissível e extremamente contagioso, causado pelo vírus pertencente ao gênero *Morbillivirus*, família *Paramyxoviridae*.

Outra família de vírus que ocasiona muitas doenças ao homem é a *Picornaviridae*, que engloba os vírus da poliomielite e da hepatite A. Diversos danos à saúde são acarretados pela infecção causada por estes vírus, entre as quais é possível citar a paralisia grave e problemas gastroentéricos (BROOKS *et al.*, 2014). Assim, a descoberta de agentes capazes de inibir a replicação destes vírus torna-se necessária.

Células de mamífero atuam como suporte para a replicação viral e testes *in vitro* com diferentes agentes podem ser efetuados para verificar sua potencial atividade como antivirais. Em geral, a avaliação dessa atividade é realizada por etapas como a infecção da cultura celular, a subsequente administração dos agentes em diferentes concentrações e, por fim, o monitoramento do efeito destes compostos quanto ao título viral verificado ao final de um período específico de incubação. Dentre as células animais que têm sido utilizadas para este fim, destacam-se as células de mamíferos como as linhagens Vero, HeLa, L929, CHO, BHK-21, MRC-5 (MORAES *et al.*, 2008; GRECO, 2009).

Neste sentido, também se torna relevante a utilização de culturas celulares para avaliação de citotoxicidade do composto estudado, pois ele pode acarretar algum tipo de dano no que se refere a aspectos metabólitos ou a redução do crescimento celular. Conforme relata MIRANDA (2007), a *International Organization for Standardization* (ISO) 10993-5 aborda que a utilização de culturas celulares estabelecidas é preferencial ao uso de culturas primárias e recomenda a linhagem L929 para testes de citotoxicidade, que segundo a autora é tida como a linhagem estabelecida para tal.

GRECO (2009) observou em seus estudos que algumas proteínas obtidas da hemolinfa da lagarta *L. obliqua* podem oferecer ação inibitória à replicação dos vírus da influenza, da poliomielite e do sarampo. Diversas frações da hemolinfa bruta, obtidas por meio de cromatografia por exclusão em gel, foram testadas em culturas de células Vero infectadas. A autora observou que a proteína AVLO em questão apresentou ação sobre o vírus do sarampo e sobre o vírus da poliomielite, concluindo que ação proteica não estaria vinculada a interação dos vírus com os receptores da membrana celular e sim agindo nas respostas intracelulares quando a proteína é adicionada antes da infecção.

SILVA (2014) aplicou a proteína recAVLOEC, obtida por meio de um sistema de expressão bacteriano, em culturas de células inoculadas com o vírus da EMC, da herpes e da rubéola. Os resultados demonstraram a redução do título do EMC em até 100.000 vezes, redução da transcrição viral do vírus da herpes e do vírus da rubéola e, a partir de diluições específicas (10^{-7} para o vírus da herpes e 10^{-4} para o vírus da rubéola), foi observada inibição total.

Embora os autores tenham verificado resultados positivos quanto à inibição da replicação viral, a maior dificuldade observada pelo grupo foi a elevada diluição em que as amostras proteicas se encontravam, além das perdas de material ocasionadas no processo cromatográfico responsável pelo fracionamento da hemolinfa.

Em vista do exposto, este estudo pretendeu, além de proporcionar a precipitação eficiente de uma proteína recombinante em um único estágio por meio do uso de sais, buscar avaliar também o uso desta proteína recuperada como agente antiviral.

CAPÍTULO 4 – MATERIAIS E MÉTODOS

A Figura 2 explicita de forma generalizada as etapas que foram realizadas neste estudo.

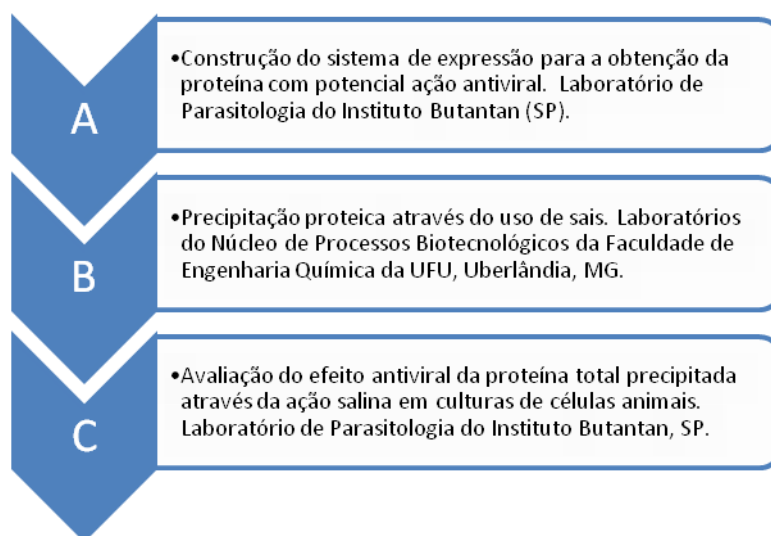


Figura 2- Etapas do estudo proposto e local de realização

4.1 SISTEMA DE EXPRESSÃO DA PROTEÍNA DE INTERESSE E PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO DA PROTEÍNA TOTAL

Amostras celulares de um clone bacteriano desenvolvido por SILVA (2014) (*E. coli* BL21 *DE3 pLysS*) para a expressão da proteína recAVLOEc com potencial ação antiviral foram cedidas pelo pesquisador Dr. Ronaldo Zucatelli Mendonça (Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan, SP) e armazenadas a -30°C . As células foram descongeladas, sob temperatura ambiente, e ressuspensas em solução tampão fosfato salino PBS ($\text{pH} = 7$). Neste momento, foi adicionado um anti-proteolítico (*Protease Inhibitor Cocktail*, Sigma-Aldrich, EUA) na proporção de $1\ \mu\text{L/mL}$ de suspensão celular, para que só

então o procedimento de lise celular fosse executado. As células foram rompidas em ultrassom (Ultrasonic Processor, Sonics), durante o período de 20 minutos (*1 on/2 off*), em banho de gelo. Em seguida a suspensão foi centrifugada (13.824xg) por 40 minutos a 22°C para a remoção dos *debris* celulares.

4.2. DETERMINAÇÃO DA SOLUBILIDADE PROTEICA A PARTIR DO USO DE SAIS

4.2.1. Determinação da Solubilidade Proteica com Sulfato de Amônio e de Sódio

A eficácia do método de precipitação proteica foi avaliada por meio de procedimento utilizando amostras de proteína pura. Inicialmente, a proteína foi manipulada na sua forma em pó, de massa 10 mg. As amostras foram pesadas diretamente em tubos *Eppendorfs* de 1,5 mL e a cada um dos frascos foi adicionada uma quantidade diferente de solução saturada de sal e de água até atingir o volume total de 1 mL. As soluções salinas foram previamente preparadas a partir da adição de sal a água ultrapura sob agitação, até que fossem atingidas as concentrações de saturação e observada a formação de corpo de fundo. Considerando a temperatura ambiente em torno de 27°C, para o sulfato de amônio a concentração de saturação se aproxima de 86,95 mg/mL e para o sulfato de sódio 225,50 mg/mL, conforme PERRY e GREEN (2007). Os tubos foram vedados e agitados gentilmente a temperatura ambiente até que a homogeneização do material fosse verificada.

Procedimento similar também foi realizado para análise da amostra proteica em solução. Uma solução de BSA com a concentração de 30 mg/mL foi preparada e volumes variados desta solução foram adicionados a tubos *Eppendorfs* de modo a completar o volume de 1 mL, uma vez que nos mesmos já constavam os volumes de solução salina. As análises foram realizadas em duplicata.

Os frascos contendo BSA (pó ou solução) em contato com a solução saturada de sal foram mantidos por cerca de 24 horas em banho termostático a 5°C. Em seguida, o material

foi submetido à centrifugação, por 20 minutos para o sulfato de amônio e 40 minutos para o sulfato de sódio, a 13.824 x g para que o sobrenadante pudesse ser separado do precipitado. De maneira similar, o sobrenadante do lisado das células de *E. coli* modificadas para a produção da proteína de interesse foi submetido à precipitação com sulfato de amônio e sulfato de sódio. Entretanto foram adotadas apenas duas variações na quantidade de sal equivalentes a: 95% de sal e 5% de proteína; 90% de sal e 10 % de proteína. A proteína total foi quantificada pelo método de Bradford (1976).

4.2.2. Determinação da Solubilidade Proteica com Carbamato de Amônio

A eficácia do método de precipitação com o sal volátil carbamato de amônio foi inicialmente avaliada com a proteína pura tripsina suína em concentração de 20 mg/mL. A avaliação da precipitação da tripsina foi realizada com a proteína em pó, diretamente pesada em tubos *Eppendorf* de 1,5 mL, e também em solução. A cada um dos tubos foi adicionada uma quantidade diferente de solução saturada de sal. Uma solução salina foi novamente preparada conforme supracitado. Considerando a temperatura ambiente em torno de 27°C, para o carbamato de amônio a concentração de saturação se aproximou de 720 mg/mL.

A precipitação com carbamato de amônio também foi conduzida com amostras do sobrenadante do lisado das células de *E. coli* contendo a proteína recAVLOEC. Novamente foram utilizadas apenas as variações: 95% de sal e 5% de proteína; 90% de sal e 10 % de proteína. A proteína total foi quantificada pelo método de Bradford (1976).

É importante salientar que o precipitado obtido foi armazenado (-30°C) para fins de liofilização e posterior remoção do sal.

4.2.3. Remoção do Sal Volátil Através de Liofilização

Após a precipitação com os sais, a fase do precipitado foi congelada a -30°C e liofilizada (L101, LIOBRAS) por cerca de 24 horas para a completa remoção do sal volátil. A pressão final observada durante o procedimento foi de até 377 µHg.

4.3. CÉLULAS E VÍRUS

Células da linhagem Vero, derivada do rim do macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*), apresentando dependência de ancoragem, foram utilizadas. Neste projeto, também foi empregado o vírus do sarampo cepa Edmonston, também mantido no Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan. De forma complementar, células da linhagem L929, originadas do tecido adiposo de camundongos, também doadas pelo pesquisador Ronaldo Z. Mendonça, e apresentando dependência de ancoragem foram utilizadas nos ensaios de citotoxicidade e de ação antiviral da proteína precipitada.

O picornavírus da EMC foi avaliado quanto à ação antiviral da proteína precipitada. Além disso, o vírus do sarampo, também doado pelo Dr. Ronaldo Zucatelli Mendonça, também foi avaliado quanto à atividade antiviral da proteína de interesse.

4.4 CULTURAS DE CÉLULAS VERO E L929 *in vitro*

As linhagens de células Vero e células L929 foram cultivadas em monocamada (frasco T-25) em meio L-15 com 10% de soro fetal bovino e incubadas a 37°C em ambiente isento de dióxido de carbono. Subcultivos sucessivos, para a retirada de meio condicionado e a adição de meio fresco, foram efetuados a cada três dias. Uma solução de protease 0,25% (m/v) tripsina-EDTA (Life Technologies, EUA) foi empregada no processo de remoção celular do suporte na qual a célula permanecia ancorada para que a propagação celular fosse observada.

4.5. AVALIAÇÃO DO EFEITO TÓXICO DOS PRECIPITADOS PROTEICOS OBTIDOS POR AÇÃO SALINA EM CULTURAS DE CÉLULAS L929

Para a verificação da toxicidade das amostras protéicas obtidas pelo o uso dos diferentes sais (sulfato de amônio, de sódio e carbamato de amônio) como agentes precipitantes, culturas

de células L929, mantidas em placas de 96 poços, foram utilizadas. Para tal, amostras protéicas foram adicionadas aos poços na proporção de 2% (v/v). As soluções protéicas avaliadas apresentaram concentrações iniciais de 190,5 mg/mL, 493,88 mg/mL e 156,17 mg/mL, respectivamente, para as amostras precipitadas com o sulfato de amônio, carbamato de amônio e sulfato de sódio. A análise de citotoxicidade foi realizada após 72 h da administração da solução proteica nas culturas celulares. Estas soluções foram previamente diluídas antes de serem administradas nas células, sendo que, para aquelas precipitadas com sulfato de amônio as diluições empregadas foram de 32x (5,95mg/mL), 64x (2,97 mg/mL) e 128x (1,50 mg/mL). Para as amostras precipitadas com sulfato de sódio as diluições utilizadas foram de 2x (78,08 mg/mL), 4x (39,04 mg/mL) e 8x (19,52 mg/mL). Por fim, as diluições aplicadas às amostras proteicas precipitadas com carbamato de amônio foram de 8x (61,73 mg/mL), 32x (15,43 mg/mL) e 64x (7,71 mg/mL). A morfologia das células foi observada diariamente em microscópio óptico invertido (aumento de 40x). De forma complementar, as células foram coradas com cristal violeta (0,4% m/v) como forma de potencializar a análise qualitativa do efeito tóxico das amostras proteicas em relação à cultura celular, uma vez que este corante permite a observação do núcleo das células.

4.6. AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIVIRAL

A avaliação da ação antiviral das amostras protéicas obtidas por ação salina, no lisado de bactérias que previamente expressaram intracelularmente a recAVLOEc, foi realizada usando uma cultura de células L929, mantida em uma placa multipoços e inoculada com o picornavírus da EMC. O título viral inicial aplicado foi de 10^3 TCID₅₀/mL. O vírus foi diluído serialmente na razão 2 e adicionado aos poços, permanecendo em contato com as células por 1 h. Só então as amostras protéicas foram adicionadas.

Após um período de 72h de incubação a 37°C em ambiente isento de dióxido de carbono e um procedimento de lavagem, as células mortas devido à ação da infecção viral foram removidas. Procedimento similar foi realizado para o vírus do sarampo, entretanto as células empregadas foram as células Vero. Além disso, o título viral da cepa Edmonton foi de 10^2 TCID₅₀/mL, sendo o efeito citopático avaliado após 96 h.

CAPÍTULO 5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DETERMINAÇÃO DA CURVA DE SOLUBILIDADE DA BSA EM PÓ E EM SOLUÇÃO USANDO SULFATO DE AMÔNIO

A análise da precipitação de BSA, adicionada na forma de pó, e em solução, á solução de sulfato de amônio, mostrou que a concentração da proteína no sobrenadante foi inversamente relacionada à concentração do sal na mistura, caracterizando a curva de solubilidade. Verificou-se um comportamento similar tanto para as amostras em pó (Figura 3) como para as amostras em solução (Figura 4), ou seja, à medida que concentração de sal aumentou, uma redução da concentração de proteína no sobrenadante se evidenciou. Este fenômeno caracterizou o efeito *salting-out* do sal sobre a proteína. Vale ressaltar que amostras de BSA em solução foram submetidas à precipitação usando solução saturada de sal sulfato de amônio, de maneira comparativa a precipitação da proteína em pó. As precipitações foram feitas visando avaliar os efeitos da solubilização da proteína na precipitação. Para reduzir às perdas características do processo de diluição, a solução proteica (30 mg/mL) utilizada foi de concentração superior à aplicada em pó (10 mg/mL).

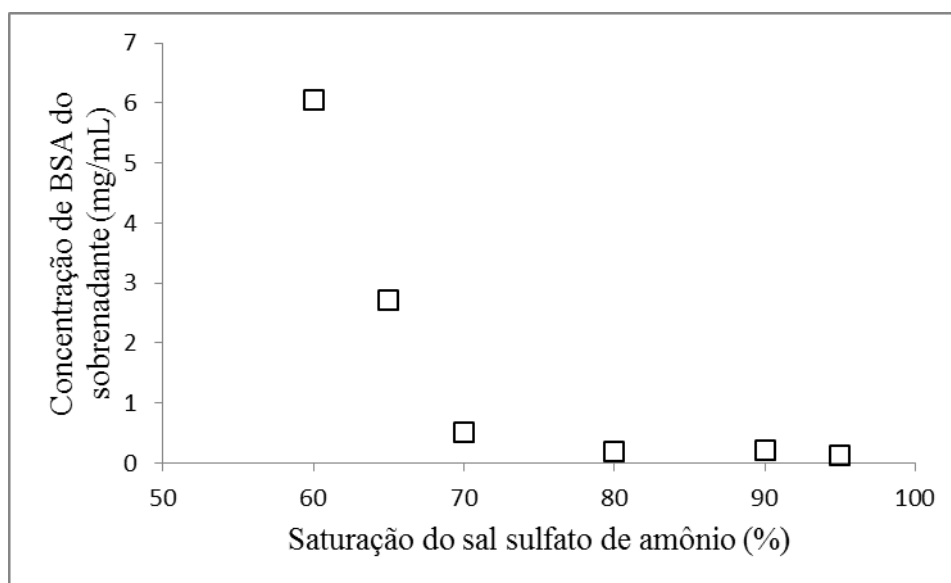


Figura 3 - Curva de solubilidade para BSA em pó usando sulfato de amônio, sendo a concentração inicial de proteína de 10 mg/mL. Diluição (250 μ L de sobrenadante/750 μ L de água).

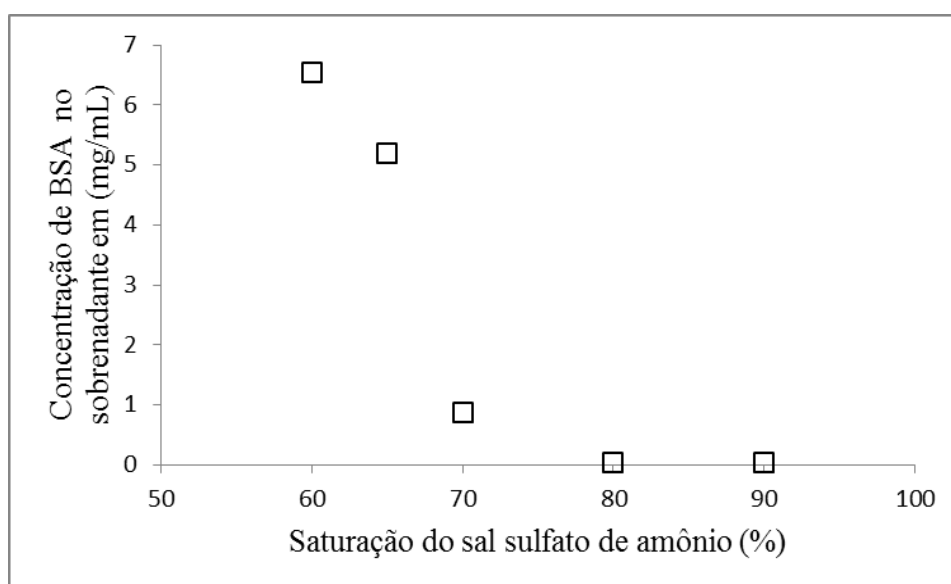


Figura 4 - Curva de solubilidade do BSA em solução usando sulfato de amônio, sendo a concentração inicial de proteína de 30 mg/mL. Diluição (250 μ L de sobrenadante/750 μ L de água).

Os resultados mostraram um comportamento similar àquele demonstrado pela adição de BSA em pó, como era esperado, com a redução da concentração proteica no sobrenadante à medida que a concentração de sal aplicada ao sistema aumentava. No caso da proteína em pó, existia apenas como fator de diluição a água presente na solução salina, enquanto que para a proteína em solução o fator de diluição foi superior devido à contribuição tanto da água utilizada no preparo da solução proteica como daquela presente na solução salina.

Os resultados obtidos se aproximaram do comportamento típico de proteínas descrito por COHN e EDSALL (1943) *apud* CHANG (2008). Os autores discutiram o comportamento da hemoglobina de cavalo mediante ao aumento da força iônica; proteína esta, assim como a BSA, de natureza solúvel e de comportamento semelhante no que diz respeito à redução da solubilidade. COHN (1936) *apud* CHANG (2008) também demonstrou a faixa específica de força iônica na qual se verifica o efeito *salting-out* da Soro Albumina C precipitada com o sulfato de amônio que está compreendida entre 6 e 7, aproximadamente.

5.2 DETERMINAÇÃO DA CURVA DE SOLUBILIDADE DA BSA (EM PÓ E EM SOLUÇÃO) USANDO SULFATO DE SÓDIO

Amostras de BSA, em pó (Figura 5) e em solução (Figura 6), foram também submetidas ao teste de precipitação utilizando solução de sulfato de sódio. O comportamento observado evidencia a redução da concentração de BSA no sobrenadante em virtude do aumento na concentração de sal adicionado a amostra. É possível observar em ambos os procedimentos uma redução na solubilidade da BSA. Como esperado, isso ocorreu em virtude do aumento da concentração de sal e consequentemente da força iônica aplicada ao sistema.

Os cálculos da constante de *salting-out*, bem como β para as precipitações efetuadas com sulfato de amônio e com sulfato de sódio foram realizados com base na equação de Cohn representada pela Equação 3. Os resultados obtidos para a proteína BSA em solução e em pó para os dois sais convencionais estão contidos na Tabela 1 e Tabela 2. Para os sais cujos íons são representados pela de série de Hofmeister, quanto maior o valor de K_s maior o efeito de *salting-out* sobre a amostra proteica.

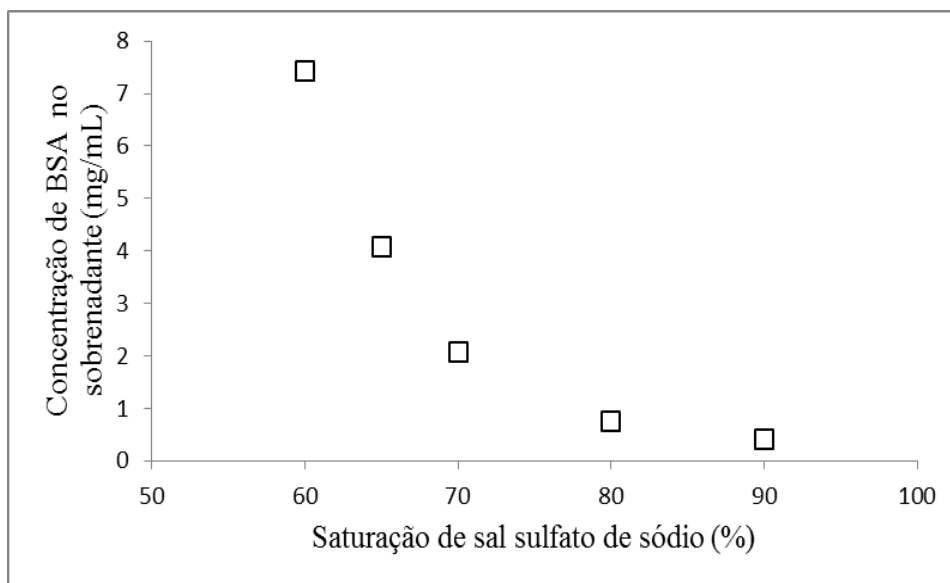


Figura 5- Curva de solubilidade do BSA em pó em sulfato de sódio, sendo a concentração inicial de proteína de 10mg/mL. Diluição (250 μ L de sobrenadante/750 μ L de água).

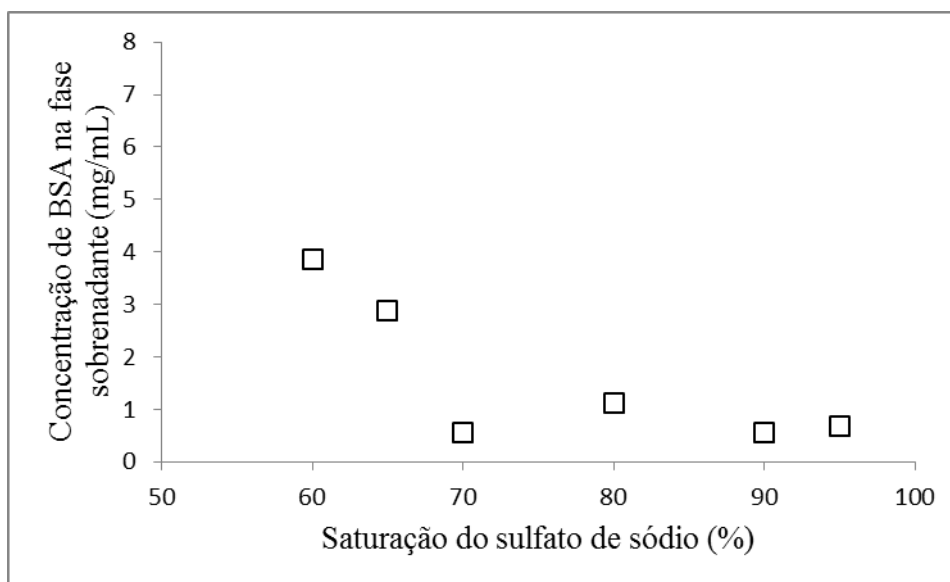


Figura 6-Curva de solubilidade do BSA em solução em sulfato de sódio, sendo a concentração inicial de proteína de 30 mg/mL. Diluição (500 μ L de sobrenadante/ 500 μ L de água).

TABELA 1- Valores da constante Ks da Equação de Cohn para BSA em pó.

Sal	Ks (mg/mL) ⁻¹	β'
Sulfato de amônio	0,0049	3,06
Sulfato de sódio	0,0123	3,13

Conforme é possível verificar na Tabela 1, os valores de Ks para amostras precipitadas usando sulfato de sódio foram superiores àqueles obtidos para amostras precipitadas usando sulfato de amônio, confirmando que este sal é mais efetivo no processo de precipitação da BSA. O mesmo comportamento também foi evidenciado quando se tratou das amostras de BSA em solução, conforme mostrado na Tabela 2.

TABELA 2- Valores da constante Ks da Equação de Cohn para BSA em solução.

Sal	Ks (mg/mL) ⁻¹	β'
Sulfato de amônio	0,0045	2,86
Sulfato de sódio	0,075	2,35

Observou-se que o valor de Ks foi maior para amostras precipitadas usando o sulfato de sódio. Este comportamento se assemelha ao observado para outras proteínas submetidas à precipitação com os dois sais, como relata PIOVANI *et al.* (2013) para precipitação da imunoglobulina G. Estes autores discutiram que os íons mais efetivos para a precipitação proteica em solução aquosa por *salting-out* foram definidos como agentes cosmotrópicos, ou seja, tais íons foram capazes de criar uma estrutura de água ao redor da molécula resultando em sua precipitação. Assim, o sal com alta capacidade de induzir o *salting-out* de uma

proteína deve apresentar um valor elevado para a constante de *salting-out* (K_s). De modo que, conforme os resultados obtidos, e analisando apenas a ação dos cátions no que diz respeito e redução da solubilidade, uma vez que os sais empregados apresentam o ânion sulfato em comum, verifica-se que o cátion Na^+ é mais efetivo do que o cátion NH_4^+ para precipitação de BSA.

5.3 DETERMINAÇÃO DA CURVA DE SOLUBILIDADE DA TRIPSINA EM PÓ USANDO SAL VOLÁTIL CARBAMATO DE AMÔNIO

Com o objetivo de validar o método de precipitação usando carbamato de amônio, precipitações com a proteína tripsina suína, na sua forma em pó, foram realizadas. O resultado está apresentado na Figura 7.

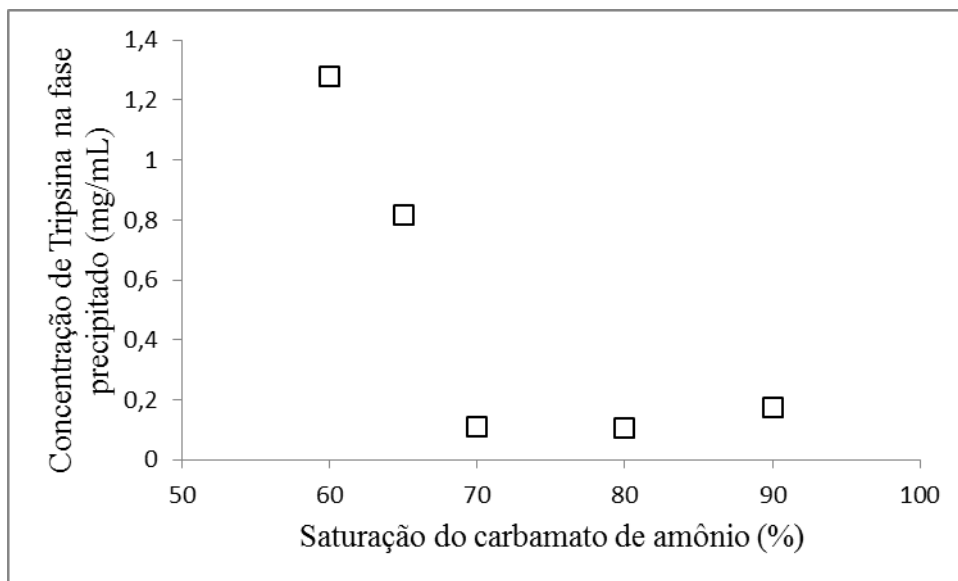


Figura 7 - Curva de solubilidade para a tripsina suína em pó usando o sal carbamato de amônio, sendo a concentração inicial de proteína de 30 mg/mL.

De forma complementar a constante de *salting-out* (K_s), bem como β foram calculadas para as amostras precipitadas de tripsina em pó, com os seguintes resultados: K_s igual a $0,0178 \text{ (mg/mL)}^{-1}$ e β igual a 8,16. Comparando-se os resultados da constante de *salting-out* (K_s) de $0,0178 \text{ (mg/mL)}^{-1}$ na precipitação da tripsina em pó com o uso do carbamato de amônio com a literatura, verificou-se que o valor obtido neste trabalho é próximo ao valor de $0,0154 \text{ (mg/mL)}^{-1}$ determinado por Watanabe (2004).

5.4 PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS CONTIDAS NO SOBRENADANTE DO LISADO BACTERIANO USANDO SAIS CONVENCIONAIS (SULFATO DE AMÔNIO E SÓDIO) E SAL VOLÁTIL (CARBAMATO DE AMÔNIO)

A precipitação de proteínas do sobrenadante do lisado celular foi realizada usando sulfato de amônio, sulfato sódio e carbamato de amônio (Figuras 8 e 9). As menores concentrações proteicas no sobrenadante foram encontradas nas amostras submetidas à precipitação usando sulfato de amônio, evidenciando que este sal, dentre os três analisados, foi o mais eficiente no sentido de concentrar as moléculas de proteína oriundas do lisado celular na fase do precipitado. É importante ressaltar que a proteína recAVLOEc estava provavelmente contida neste lisado.

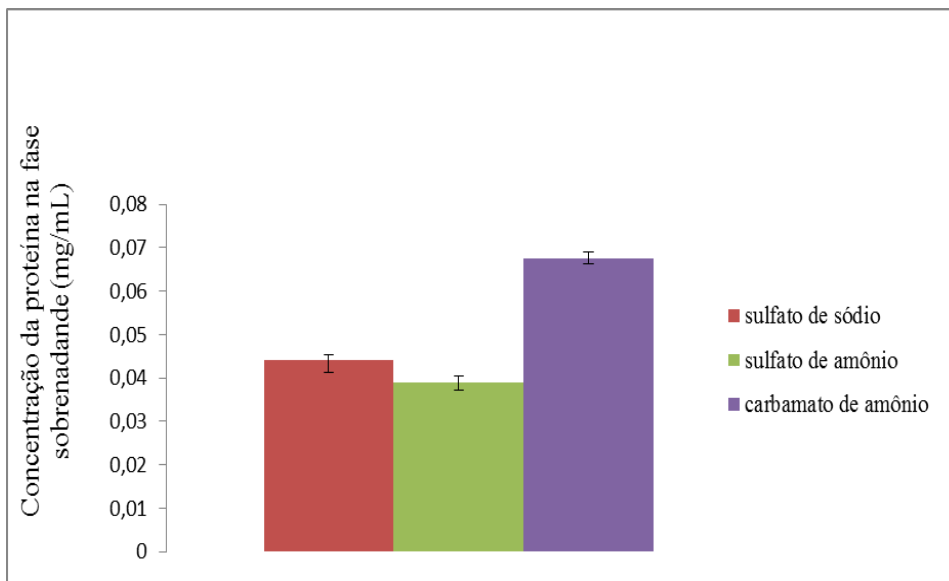


Figura 8- Eficiência de diferentes sais na precipitação de proteínas contidas no sobrenadante do lisado de *E. coli* com 95% de sal. Concentração inicial de proteína no lisado celular foi de 0,137 mg/mL.

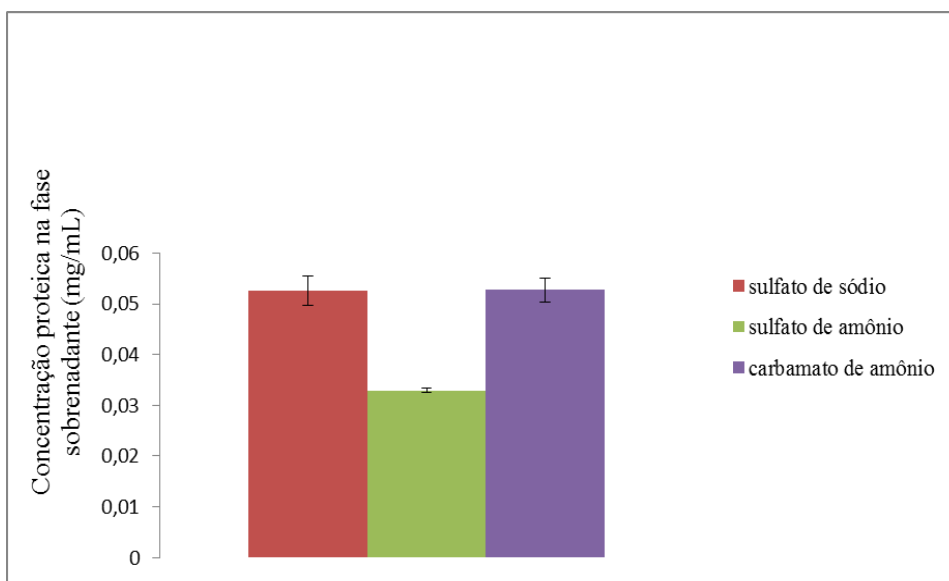


Figura 9 - Eficiência de diferentes sais na precipitação de proteínas contidas no sobrenadante do lisado de *E. coli* com 90% de sal. Concentração inicial de proteína no lisado celular foi de 0,137 mg/mL.

As amostras tratadas com o sulfato de sódio apresentaram um teor maior de proteínas na fase sobrenadante quando comparadas às amostras precipitadas com sulfato de amônio. Já o uso do carbamato de amônio apresentou o maior teor de proteína restante na fase sobrenadante, indicando ter menor eficiência na precipitação das proteínas do lisado.

Considerando que a amostra proteica oriunda do lisado bacteriano apresentou característica solúvel, os resultados obtidos se mostraram dentro do esperado, pois os ensaios conduzidos com a BSA (também de característica solúvel) e tripsina evidenciaram melhor eficiência dos sais convencionais na precipitação proteica quando comparados ao sal volátil. A série de Hofmeister para os ânions confirma que o ânion sulfato (SO_4^{2-}) é mais efetivo na redução da solubilidade proteica quando comparado ao ânion carbamato (NH_2COO^-). Em adição, verificou-se que o resultado obtido para a precipitação com o carbamato de amônio, apesar do maior teor de proteína na fase sobrenadante, viabiliza a sua adoção em virtude das vantagens associadas ao processo de remoção do mesmo.

Comparando-se exclusivamente a ação dos sais sulfato de amônio e sulfato de sódio, verificou-se que para as proteínas do lisado o sulfato de amônio foi mais efetivo concentrando mais proteínas na fase precipitado. É importante salientar também que SILVA (2014) realizou a clonagem e a expressão da proteína de interesse (recAVLOEc), originalmente contida na hemolinfa da *L. obliqua*. Este trabalho precedeu o estudo atual e nele a proteína recAVLOEc foi purificada por afinidade em virtude da presença de uma cauda de histidina, utilizando para tal *beads* magnéticas e ainda uma coluna HisTrap FF. O autor observou que o material resultante foi capaz de apresentar uma proteção celular contra o vírus da encefalomiocardite de camundongo apresentando uma proteção de até 10.000 vezes. Neste sentido, no presente estudo, as proteína contidas no lisado bacteriano, inclusive a recAVLOEc, foram precipitadas em um único estágio por meio do uso dos sais supracitados e subsequentemente os precipitados obtidos foram liofilizados e avaliados em termos de uma potencial ação antiviral considerando o vírus da EMC e do sarampo.

5.5 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS PRECIPITADOS OBTIDOS COM LISADOS BACTERIANOS EM CULTURAS DE CÉLULAS L929

Foram realizadas análises do efeito citotóxico (Figura 10), em células L929, de precipitados obtidos usando sulfato de amônio, sulfato de sódio e carbamato de amônio das amostras oriundas do lisado bacteriano. Tais células (L929) são de uso recorrente para testes desta natureza (MIRANDA, 2007). Realizaram-se diferentes diluições dos precipitados com o intuito de verificar em qual delas o efeito citotóxico ocasionado pela ação do sal na cultura celular foi mais evidente.

Conforme observado na Figura 10A, a amostra precipitada com sulfato de amônio apresentou efeito citotóxico para a cultura celular quando diluída 32x. Tal efeito foi reduzido com o aumento da diluição aplicada ao sistema (64x e 128x). Entretanto, a adoção de uma amostra muito diluída pode inviabilizar os testes em culturas de células contendo vírus, pois reduz não só a quantidade de sal presente no meio como também da proteína de interesse. Para as amostras precipitadas com o sal sulfato de sódio (Figura 10B), observou-se que nas diluições 2x e 4x o efeito tóxico ainda era verificado e a partir de 8x tal efeito foi reduzido. Assim, a diluição de 10x foi usada para testes posteriores em cultura celular.

A análise mostrada ainda na Figura 10C evidenciou que a amostra precipitada com carbamato de amônio diluída 32x apresentou baixo efeito citotóxico na cultura celular. Tal resultado era esperado uma vez que o processo de liofilização promoveu a remoção do sal volátil da amostra proteica, minimizando assim um efeito tóxico na cultura celular causado pela presença salina. Por fim, em vista da observação de que uma diluição da proteína superior a 16x e inferior a 32x não ocasionou efeito citotóxico evidente (Figura 10C), uma diluição de 20x foi empregada para a subsequente análise da avaliação da ação antiviral da proteína de interesse.

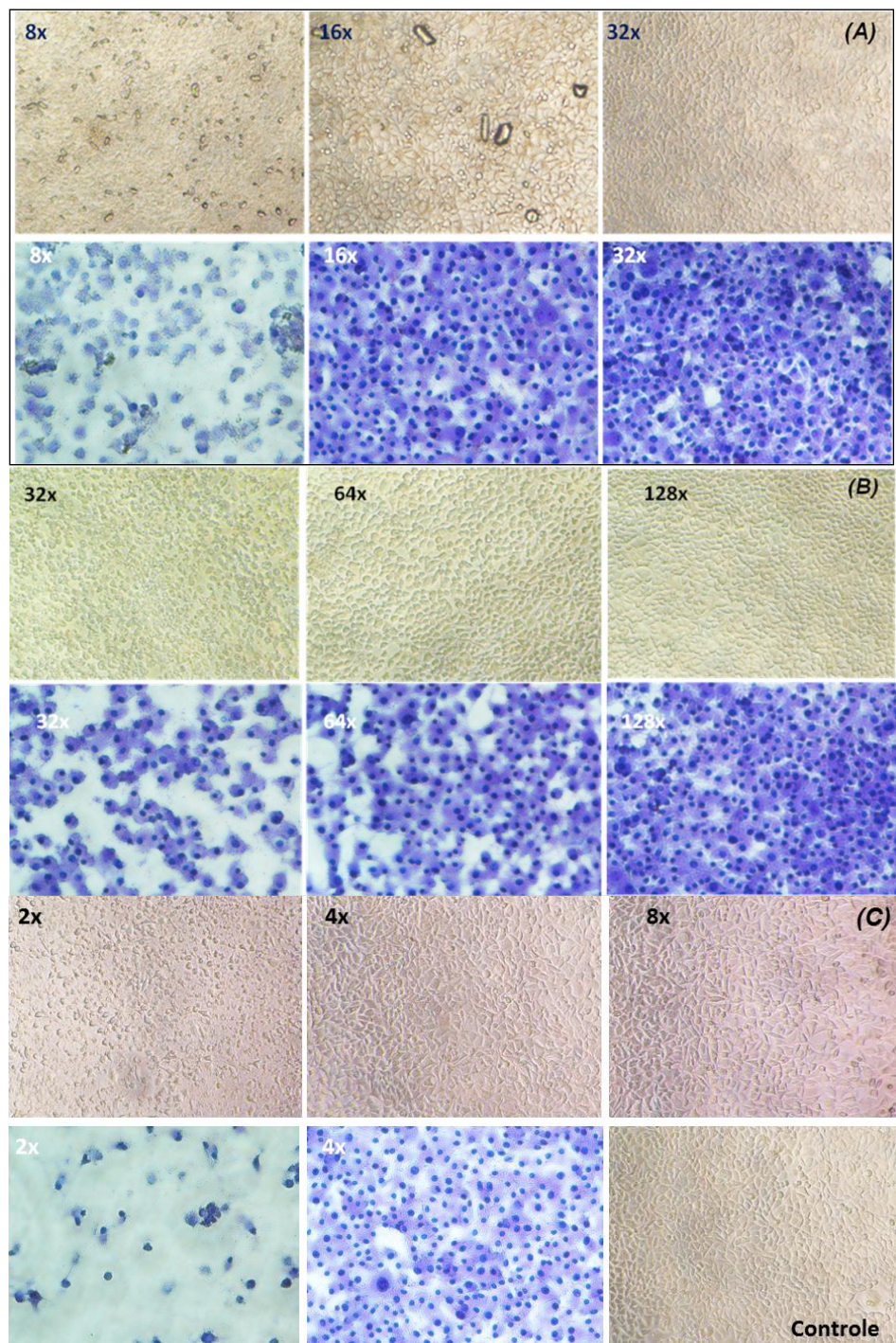


Figura 10- Avaliação qualitativa da citotoxicidade em células L929 de precipitados obtidos com (A) carbamato de amônio [diluição de 8x (61,73mg/mL), 16x (30,86 mg/mL) e 32x (15,44 mg/mL)]; (B) sulfato de amônio [diluição de 32x (5,95 mg/mL), 64x (2,97 mg/mL) e 128x (1,48 mg/mL)]; (C) sulfato de sódio [diluição de 2x (78,08 mg/mL), 4x (39,04 mg/mL) e 8x (19,53 mg/mL)]. *As células tiveram também o núcleo corado com cristal violeta. Controle: cultura de células L929 sem adição de precipitados.

5.6 AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIVIRAL DO PRECIPITADO PROTEICO EM CULTURAS DE CÉLULAS INOCULADAS COM VÍRUS

A avaliação da ação antiviral (Figura 11) das amostras de lisado bacteriano precipitadas usando sulfato de amônio, sulfato de sódio e carbamato de amônio, foi realizada por meio de placa multipoços contendo culturas de células inoculadas com vírus da EMC.

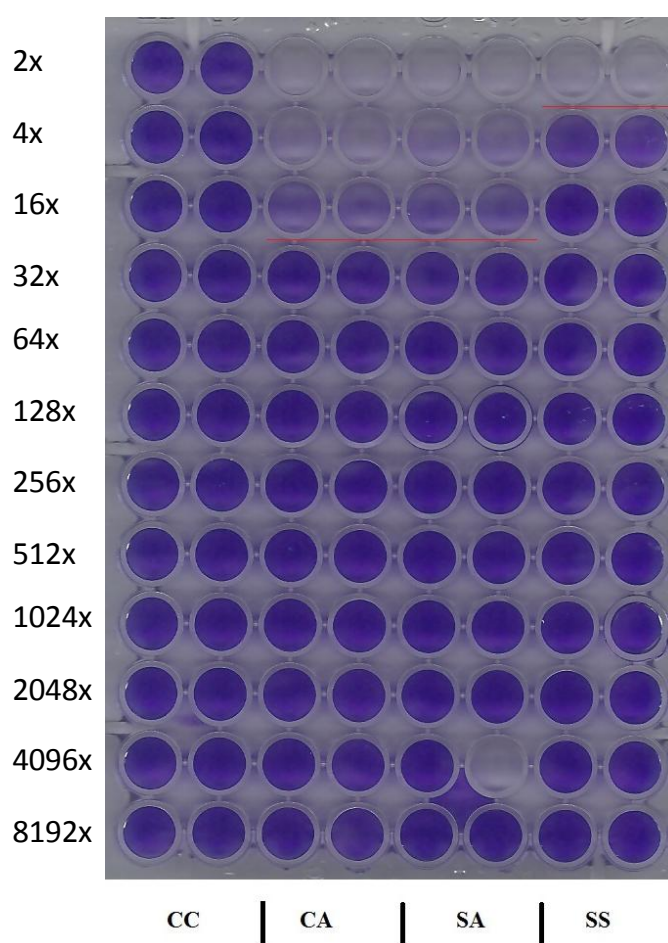


Figura 11- Avaliação do efeito antiviral do precipitado do lisado bacteriano obtido com (CA) carbamato de amônio (24,7mg/mL); (SA) sulfato de amônio (1,90 mg/mL) e (SS) sulfato de sódio (15,61 mg/mL). Controle (CC): cultura de células L929 mantidas em meio L15 com 10% SFB. À esquerda constam as diluições em série aplicadas ao vírus EMC que inicialmente apresentou título viral de 10^3 TCID₅₀/mL e diluição na razão 2.

Conforme é possível observar na Figura 11, a ação do EMC não foi reduzida na presença dos precipitados proteicos, já que nenhuma das amostras, mesmo as precipitadas mediante o sal carbamato de amônio (que apresentou efeito citotóxico reduzido para as células), minimizaram o efeito citopático do vírus da EMC. Vale ressaltar que este efeito é verificado à medida que a intensidade do azul, oriundo da presença do corante cristal violeta, dos poços da placa se reduz. Essa redução da cor sugere morte das células e que após o procedimento de lavagem as mesmas foram removidas da placa. De forma complementar, não se estabeleceu uma diferença marcante entre os efeitos ocasionados pelas as amostras protéicas CA, SA e SS.

Segundo SILVA (2014), a proteína recAVLOEc tem ação intracelular, podendo atuar diretamente nos mecanismo de replicação viral. Entretanto, é necessário se considerar que a proteína precipitada pode ter sofrido algum tipo de desnaturação por ação salina, ocorrida durante o procedimento de precipitação do lisado, mesmo na presença de um agente anti-proteolítico. Neste sentido, sua ação biológica para o vírus testado pode ter sido afetada. Por fim, há de se considerar que a proteína em questão pode realmente não apresentar ação antiviral para o vírus da EMC.

Na sequencia, culturas de células Vero também foram inoculadas com diferentes diluições virais na presença dos mesmos precipitados salinos. Conforme a Figura 12 verificou-se ação antiviral do precipitado proteico obtido por meio do sulfato de sódio a partir da diluição de 4x, tornando o precipitado obtido por este sal o mais efetivo na redução da ação viral quando comparado a ação das demais amostras protéicas (CA e SA).

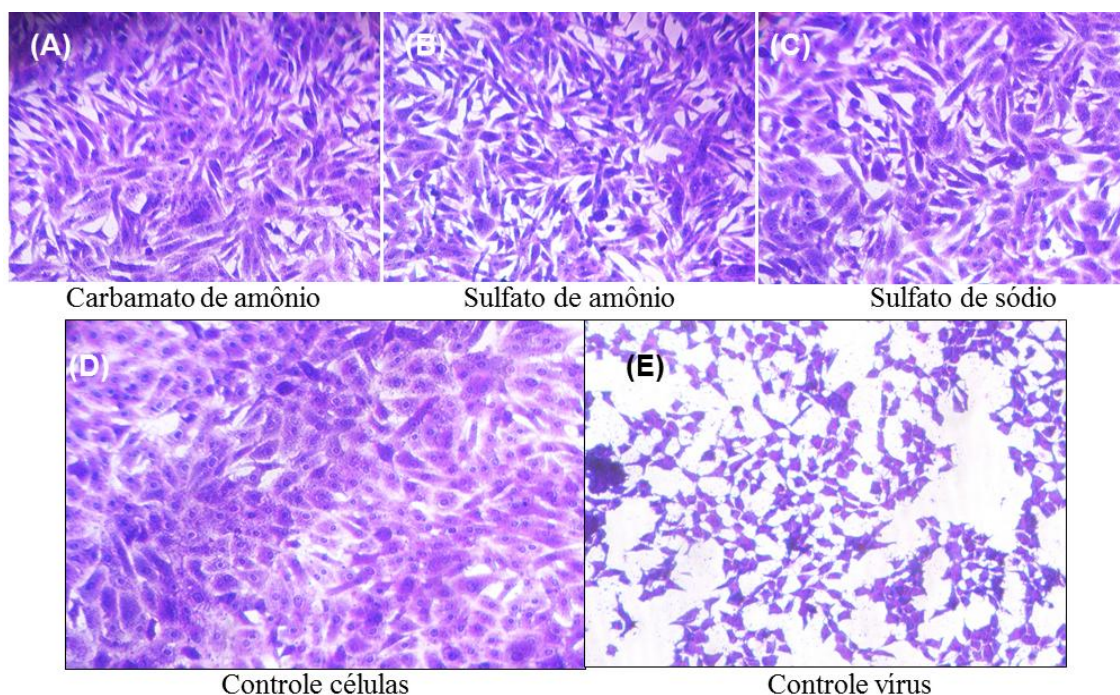


Figura 12 - Avaliação do efeito protetor de precipitados salinos em culturas de células Vero inoculadas com vírus do sarampo. (A) carbamato de amônio 8x; (B) sulfato de amônio 8x e (C) sulfato de sódio 4x. As células foram coradas com cristal violeta (0,4% m/v). (D) Controle: cultura de células Vero não infectadas e (E) cultura de células Vero infectadas com o vírus do sarampo na diluição de razão 2. O título viral inicial do vírus do sarampo foi de 10^2 TCID₅₀/mL.

É importante salientar que embora não tenha sido mostrada a placa multipoços, o vírus do sarampo mostrou efeito citopático até a diluição de 8x. As amostras proteicas precipitadas por meio do carbamato de amônio e sulfato de amônio não promoveram proteção até esta mesma diluição. Entretanto, para a amostra proteica precipitada com sulfato de sódio a última diluição na qual ainda se observa ação viral pode ser encontrada entre as diluições 4x e 8x. Isto sugere que nesta condição uma proteção foi verificada.

CAPÍTULO 6 – CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Este trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência do uso de sais na recuperação de proteínas obtidas através de um sistema procarionte de expressão. Para isso, inicialmente foram realizados testes visando avaliar o efeito de sais convencionais (sulfato de sódio e sulfato de amônio) e do sal volátil carbamato de amônio na precipitação de proteínas purificadas conhecidas (BSA e Tripsina suína). Após isso, a precipitação de um lisado bacteriano contendo a proteína recAVLOEc, com potencial ação viral, também foi efetuada. Uma vez obtido o precipitado, esta amostra proteica foi avaliada em termos de sua possível ação contra o vírus da EMC e do sarampo.

De forma geral foi possível concluir que:

- O sulfato de sódio foi mais eficiente na precipitação da BSA quando comparado ao sulfato de amônio. Este fato foi confirmado através do cálculo da constante de *salting-out* (Ks) para ambos os sais.
- A tripsina apresentou redução da solubilidade em função do aumento da concentração de carbamato de amônio.
- Os sais convencionais (sulfato de sódio e sulfato de amônio) foram eficientes na precipitação proteica, porém com limitada aplicabilidade na concentração da recAVLOC, apresentando resultados mais efetivos com sulfato de amônio, em relação a quantidade de proteína precipitada do que com o sulfato de sódio.
- Os testes citotóxicos evidenciaram que a remoção do sal carbamato de amônio por meio do processo de liofilização foi satisfatória.
- Amostras proteicas precipitadas usando sulfato de amônio e sulfato de sódio apresentaram efeito citotóxico considerável sobre a cultura de células L929 nas diluições empregadas.

- Os precipitados dos lisados celulares contendo a proteína recAVLOEc e obtidos com os sais sulfato de amônio, sulfato de sódio e carbamato de amônio não apresentaram efeito protetor para o vírus da EMC.
- O precipitado proteico contendo a proteína-alvo e obtido pela ação salina do sulfato de sódio mostrou uma proteção contra a ação do vírus do sarampo para quando verificada uma diluição de 4x.

Etapas futuras a este trabalho envolverão:

- Verificar a presença da proteína recAVLOEc, por meio de eletroforese em gel nas amostras do lisado bacteriano, visando analisar possíveis efeitos degenerativos da ação salina na proteína-alvo.
- Detalhar com maior profundidade a análise da ação do sulfato de sódio, do sulfato de amônio e do carbamato de amônio para a proteção de culturas de células inoculadas com vírus do sarampo. Para tal, além da liofilização, etapas de diálise deverão ser realizadas, para que uma vez removido o sal convencional, as amostras proteicas possam ser avaliadas quanto sua ação antiviral.
- Testes de ação antiviral do lisado bacteriano concentrado por meio de precipitação salina para outros vírus, diferentes dos aqui analisados e em outras condições, como por exemplo, com o vírus da herpes e da rubéola.

ANEXO

Curva de calibração Micro e Macro ensaio da metodologia de Bradford

- 1) Preparar a solução de BSA (Soro de Albumina Bovino) 0,1 mg/mL: Pesar 0,01 g de BSA. Dissolver com água ultrapura cuidadosamente para evitar a formação de bolhas. Completar o volume até atingir 100 mL (balão volumétrico).
- 2) Preparar as diluições em tubos *Eppendorf*, em triplicata, conforme as tabelas abaixo. As Tabelas 5 e 6 fazem referência as curvas de calibração para o micro e macro ensaios respectivamente.

TABELA 3 - Diluições aplicadas para a curva de calibração do micro ensaio

Concentração (mg/mL)	Fator de diluição	Volume de BSA (µL)	Volume de água (µL)
0,00	...	0	100
0,01	10	10	90
0,02	5	20	80
0,04	2,5	40	60
0,06	1,67	60	40
0,08	1,25	80	20
0,10	1	100	0

TABELA 4 - Diluições aplicadas para a curva de calibração do macro ensaio

Concentração (mg/mL)	Fator de diluição	Volume de BSA (μL)	Volume de água
0,00	-	0	1000
0,10	10	100	900
0,20	5	200	800
0,40	2,5	400	600
0,60	1,67	600	400
0,80	1,25	800	200
1,0	1	1000	0

- 3) Transferir 20 μ L de cada solução para novos *Ependorfs*, em triplicata para o macro ensaio e 100 μ L para o micro ensaio;
- 4) Adicionar 1000 μ L de reagente de Bradford em cada *Ependorf*.
- 5) Agitar cada *Ependorf* durante 5 segundos.
- 6) Esperar 10 minutos para a reação ocorrer.
- 7) Fazer as leituras em espectrofotômetro, para um comprimento de onda de 595 nm , o mais rápido possível.
- 8) Utilizar cubetas plásticas.

CAPÍTULO 7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ATKINS.P.W; JONES.L. Princípios de Química questionando a vida moderna e o meio ambiente. 5 ed. Porto Alegre –RS, Artmed , 2010.911 p.

BELJELARSKAYA, S. N. A Baculovirus expression system for insect cells. Molecular Biology, v. 36, p. 281–292, 2002.

BRADFORD, M. Analytical Biochemistry, v72, p.248-254, 1976.

BROOKS,G.F.;CARROL K.C.; BUTEL,J.S; MORSES,A.;MIETZNER,T.A. Microbiologia Médica de Jawetz, Melnick & Adelberg 26.ed.AMGH.p.872, 2014.

CARMO, A. C. V.; GIOVANNI, D. N.S.; CORREA, T. P.; MARTINS, L.M.; STOCCO, R. C.; SUAZO, C. A. T.; MORAES, R. H. P.; VEIGA, A. B. G.; MENDOÇA, R. Z. Expression of an antiviral protein from *Lonomia obliqua* hemolymph in baculovirus/insect cell system. Antiviral Research, v.94, p.126-130,2012.

CHANG,R. Físico-Química para as ciências químicas e biológicas. 3 ed. São Paulo, McGraw Hill, 2008,618 p.

CHEN, X.; XIA,Y.;SHEN^a,W.; FAN^a,Y.; GODVENDER.A; ZHENG- XIONG.W. Engineering glycolysis branch pathways of *Escherichia coli* to improveheterologous protein expression. Process Biochemistry v. 49 p.2063–2070, 2014.

CROWELL, A.M.J; DOUCETTE, A.A. Maximizing recovery of water-soluble proteins through acetone precipitation. Analytica Chimica Acta v.796, p.48–54, 2013.

CUNHA, N.B. Expressão de cinco proteínas de interesse Farmacológico em Sementes Transgênicas de soja.[*Glycine max,L. (Merril)*].Dissertação de Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia. Universidade Católica de Brasília,2008. Disponível em:< http://www.bdtb.uepb.br/tede/tde_busca/arquivo.php?codArquivo=708>. Acesso em 18 de fevereiro de 2014.

DA SILVA, L. L.; PESSÔA, F.P. A.; MIRANDA, E. A. Evaluation of the effect of ammonium carbamate on the stability of proteins. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v.85, p.962–967, 2010.

FENNEMA, O. R.; DOMODARANS, S.; PARKIN, K.L. *Química dos alimentos de Fennema*. 4. ed. Porto Alegre, Artmed, 2010, 900 p.

FRESHNEY, R.I. *Culture of animal cells: a manual of basic technique*. 6.ed. Wiley Blackwell. 2011, 768 p.

GALESI, A.L.L. Cultivo de Células de *Drosophila melanogaster* em Diferentes Formulações de Meios de Cultura Livres de Soro Visando a Produção da Glicoproteína do Vírus da Raiva. Tese de Doutorado Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química. Campinas , 2007.

GAVA,A.J; SILVA C.A.B; FRIAS J.R.G. *Tecnologia de alimentos Princípios e Aplicações*. NBL, 9.ed.2009,511 p.

GRECO, K.N. Estudo de proteínas obtidas de hemolinfa de *Lonomia Oblíqua* com ação antiviral. Dissertação de Mestrado Inter unidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan /IPT. São Paulo. 2009.

KARP, G. *Biologia celular e molecular: Conceitos e experimentos*. 3.ed. Barueri, SP, Manole, 2005,739 p.

KARACA, A.C ; LOW,N.; NICKERSON,M.; Emulsifying properties of canola and flaxseed protein isolates produced by isoelectric precipitation and salt extraction. *Food Research International* v.44, p. 2991–2998, 2011.

KHOW, O.; SUNTRARACHUN, S. Strategies for production of active eukaryotic proteins in bacterial expression system. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, v.2, p.159-162, 2012.

MANH, A.; REYES A.; ZAMORANO, M.; CIFUENTES, W.; ISMAIL, M. Depletion of highly abundant proteins in blood plasma by hydrophobic interaction chromatography for proteomic analysis. *Journal of Chromatography B*. v. 878, p.1038-1044, 2010.

MARIAM, S.H. S; OOI^c,C.W; TAN^a,W.S; JANNA,O.A; ARBAKARIJA^e, A.; TEY^{c,f},B.T. Purification of rabbit polyclonal immunoglobulin G with ammonium sulphate precipitation and mixed-mode chromatography. *Separation and Purification Technology* . v.144, p. 133–138, 2015.

MELLES ,H.H.B .;COLOMBO,S.; LEMOS, E.R.S. Isolamento de Rickettsia em cultura de células vero. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* vol.3, p.469-473, 1999.

MIRANDA, R.B. Citotoxicidade de alguns cimentos reparadores de perfurações radicular sobre células L929. Dissertação de mestrado em Odontologia-Universidade Grande Rio-2007.

MOLINARO,E.M;CAPUTO,E.F.G;AMENDOEIRA,M.R.R (Org.).Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde.2º ed. Rio de Janeiro. Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio/Fundação Oswaldo Cruz. 2010.253 p.

MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. P.; CASTILHO, L. Tecnologia de Cultivo de Células Animais: de biofármacos a terapia gênica.1 ed. São Paulo.Ed. Roca, 2008, 503 p.

NAKAMURA, M.;YAMADA, K. Studies on diabectc KK strain of the house Diabetologia 3, 1967,212-221p.

ONUBR-Nações Unidas no Brasil. Agências da ONU apontam queda global de 78% nas mortes por sarampo. 2014. Disponível em:< <http://www.onu.org.br/agencias-da-onu-apontam-queda-global-de-78-nas-mortes-por-sarampo/>>. Acesso em: 7 de fevereiro de 2014.

ONUBR-Nações Unidas no Brasil. OMS: Mortes por sarampo caem 71%, mas surtos em algumas regiões comprometem progresso. 2013.Disponível em: < <http://www.onu.org.br/oms-mortes-por-sarampo-caem-71-mas-surtos-em-algumas-regioes-comprometem-progresso/>>. Acesso em: 10 de fevereiro de 2014.

PEREIRA, C. A.; CORREA, A.D.; SANTOS, D.S.; ABREU, C.M.P.A; SOUZA, R.V; MAGALHAES, M.M. Hemaglutinina de folhas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz):Purificação parcial e toxicidade. Ciênc. agrotec., Lavras, v. 32, p. 900-907, 2008.

PESSOA ,A.R; KILIKIAN, B.V. Purificação de produtos biotecnológicos. Barueri. São Paulo, Manole, 2005, 444 p.

PERRY, R.H; GREEN, D.W. Perry's chemical engineers' handbook. 7 ed. McGrall- Hill. 2007.2643 p.

PIOVANI,F.P.;MARINHO,C.M.;WATANABE,E.O. Solubilidade de imunoglobulina G em soluções de sais. Blucher Chemical Engineering Proceedings. v. 1,2014.

POPOVA, E, WATANABE, E. O., PESSÔA, F. P. A., Maurer, G. Phase equilibria for salt induced lysozyme precipitation: Effect of salt concentration and pH. Chemical Engineering and Processing, v.47, p.1026–1033, 2008.

PRATA, A. P; SGARBIERI,V.C. Obtenção e caracterização química e nutricional in vitro das proteínas do soro de sangue bovino. Ciênc. Tecnol. Aliment. v.25 ,p. 327-332 ,2005.

REMIÃO, J.O.R. S; SIQUEIRA, A.J. S; AZEVEDO, A.M.P. Bioquímica: guia de aulas práticas. 1º ed. Porto Alegre. EDI-PUCRS, 2003.214 p.

Reducing global measles mortality. Resolution of the executive board of the who.22 de janeiro de 2003.Disponível em : <
http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_docman&task=cat_view&gid=1189&Itemid=423>.Acesso em 25 de fevereiro de 2014.

RYAN, J.Introduction to Animal Cell Culture. Technical Bulletin, 2008. Disponível em:<http://www.level.com.tw/html/ezcatfiles/vipweb20/img/20297/intro_animal_cell_culture.pdf>.Acesso em 13 de fevereiro de 2014.

SILVA, D. G. Clonagem e expressão de proteína antiviral presente na hemolinfa de *Lonomia obliqua* por tecnologia de DNA recombinante em *Escherichia coli*. Tese de Doutorado em

Biotecnologia - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

SOUZA, T.M.M. Produção de proteínas de interesse terapêutico em células de mamíferos em cultura. Dissertação de Mestrado em Biologia Molecular da Universidade de Brasília. Brasília, 2006.

SOMMER, R.; TSCHELIESSNIG, A.; SATZER, P.; SCHULZ, H.; HELK, B.; JUNGBAUER, A. Capture and intermediate purification of recombinant antibodies with combined precipitation methods. *Biochemical Engineering Journal*, v.93, p.200-211, 2015.

TSCHELIESSNIG, A.; SATZER, P.; HAMMERSCHMIDT, N.; SCHUIZ, H.; HELK, B.; JUNGDAUER, A. Ethanol precipitation for purification of recombinant antibodies. *Journal of Biotechnology*, v.188, p.17-28, 2014.

TAKATA, C.S.; KUBRUSLY, F.S.; MIYAKI, C.; MENDES, I.F.; RIZZO, E. Suscetibilidade da linhagem de células Vero a cepas vacinais do vírus do sarampo. *Rev. Saúde Pública*, v.28, p.209-12, 1994. Disponível em: < <http://www.scielo.org/pdf/rsp/v28n3/08.pdf> >. Acesso em 13 de fevereiro de 2014.

TANAKA, R., AMORIM, M.. O mercado e as possibilidades da indústria de biofármacos no Brasil. *Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba*. ISSN eletrônico 1984-4840, Sorocaba, 16, jun. 2014. Disponível em: <<http://revistas.pucsp.br/index.php/RFCMS/article/view/19691>>. Acesso em: 10 Ago. 2015.

TAVARES, A.A.S.; TAVARES, J.M.R.S. Relatório Interno-Princípios gerais de culturas de células e citometria de fluxo para avaliação dos efeitos da radiação ionizante. Faculdade de Engenharia de Universidade do Porto. Portugal, 2009. Disponível em : <http://paginas.fe.up.pt/~tavares/downloads/publications/relatorios/RelInt_AT_JT_07_09.pdf > . Acesso em 13 de fevereiro de 2014.

TWYMAN, R.M., STOGER, E.; SCHILLBERG, S.; CHRISTOU, P.; FISCHER, R. Molecular farming in plants: host systems and expression technology. *Trends in Biotechnology* v. 21, 2003, p. 570-578.

VOET, D.; VOET, J. G. Bioquímica. 4 ed. São Paulo. Artmed. 2013.1504 p.

XU.J; LI.J; WU.X *et al.* Expression and refolding of bioactive a-bungarotoxin V31 in *E. coli*. Protein Expression and Purification v.110, p.30–36, 2015.

WANDERLEY, M.S.O. Produção de proteínas utilizando leveduras como sistemas de expressão. Tese de doutorado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pernambuco, 2011. Disponível em http://www.repositorio.ufpe.br/bitstream/handle/123456789/1656/arquivo2827_1.pdf?sequence=1&isAllowed=> .Acesso em 13 de julho de 2015.

WARREN,T.K; LUND,S.A; JONES,Q.F; HRUBY.D.E. Development of PLEX, a plasmid-based expression system for production of heterologous gene products by the gram-positive bacteria *Streptococcus gordonii*. Protein Expression and Purification. v.40, p.319–326, 2005.

WATANABE, E. O., PESSÔA FILHO, P. A., Miranda, E. A., Mohamed, R. S. Evaluation of the use of volatile electrolyte system produced by ammonia and carbon dioxide in water for the salting-out of proteins: Precipitation of porcine trypsin. Biochemical Engineering Journal, v30, p.124–129, 2006.

WATANABE, E. O., POPOVA, E., Miranda, E. A., Maurer, G., Pessôa Filho, P. A. Phase equilibria of lysozyme precipitation with the volatile salt ammonium carbamate. *Fluid Phase Equilibria*, v.292, p. 42–47, 2010.

WATANABE, E. O. Estudo da precipitação de tripsina com o uso de sais voláteis. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

YOSHIKAWA,H.; HIRANO, A.; ARAKWA, T.J; SHIRAKI,K. Mechanistic insights into protein precipitation by alcohol. International Journal of Biological Macromolecules, v.50, p.865-871, 2012.

APÊNDICE

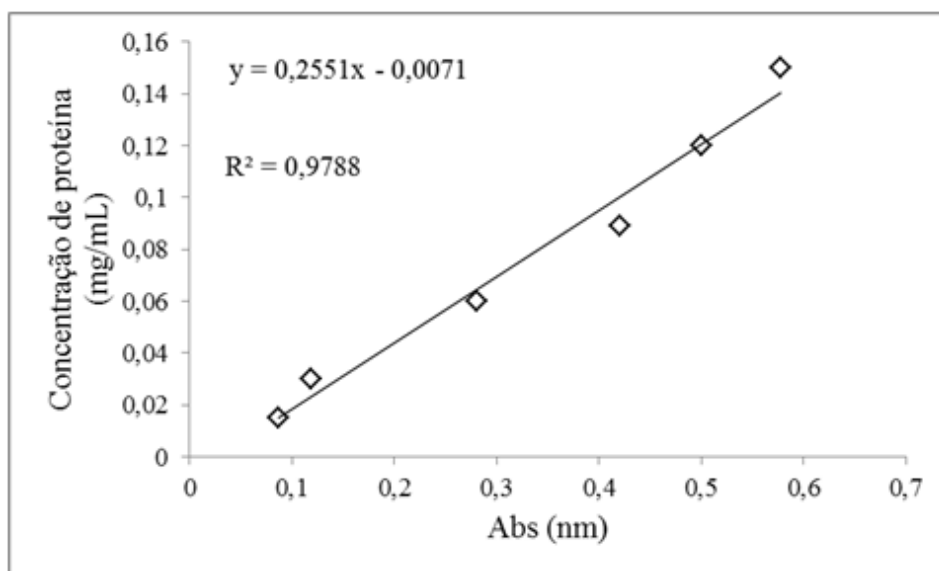


Figura A1-Curva de calibração Bradford micro ensaio

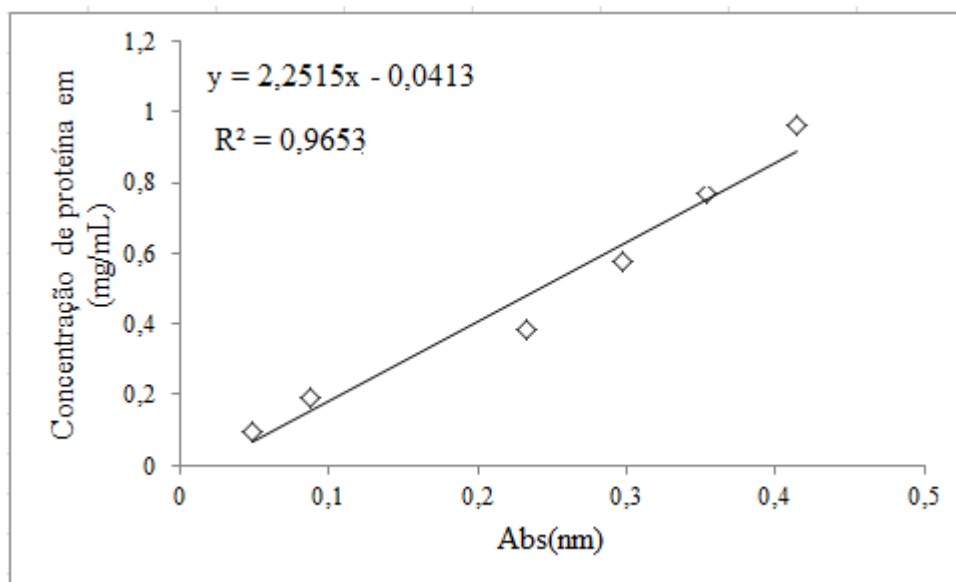


Figura A2-Curva de calibração Bradford macro ensaio

Linearização da Equação de Cohn para cálculo de K_s e β

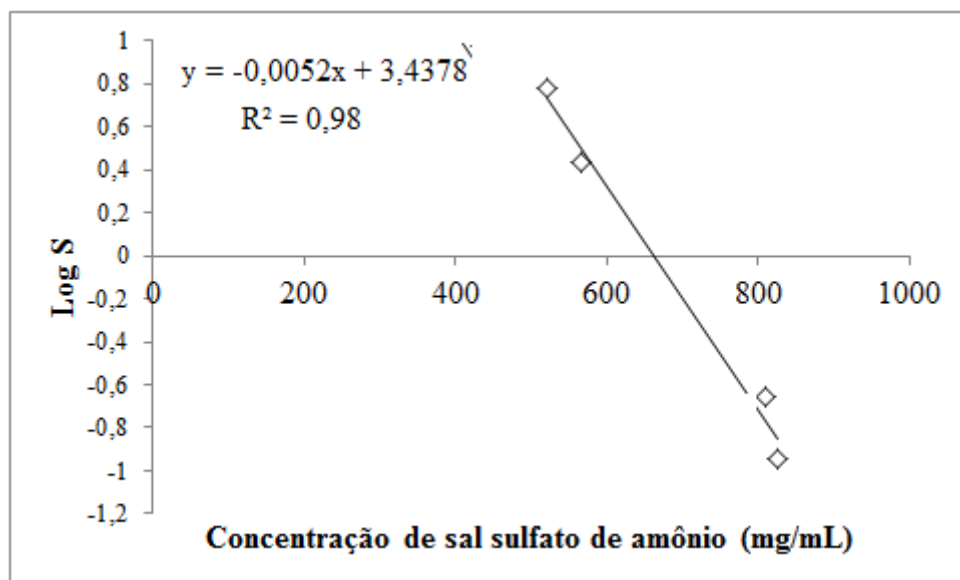


Figura A3- Linearização da equação de Cohn para o BSA em pó.

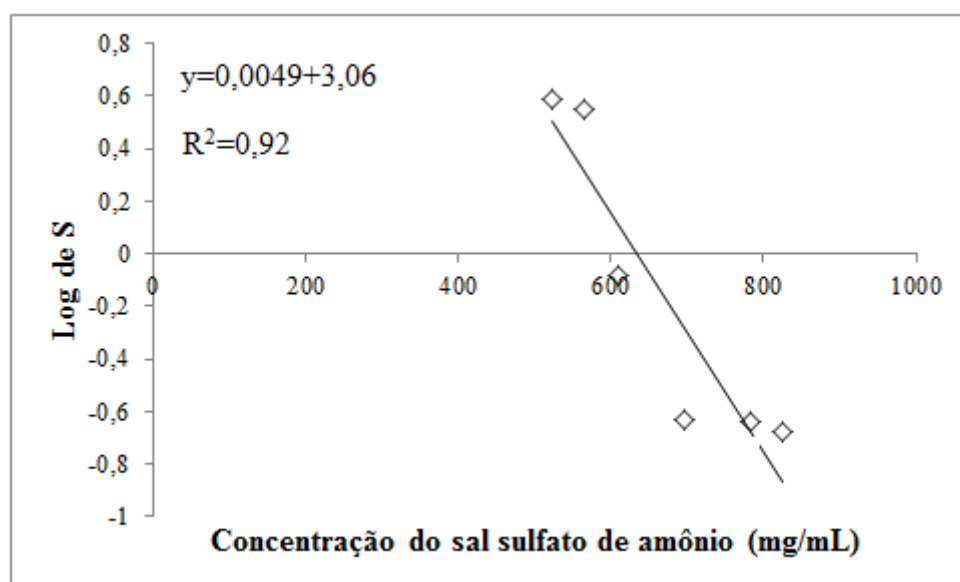


Figura A4-Linearização da Equação de Conh para BSA em solução.

Dados da Equação de Cohn para BSA precipitada com sulfato de sódio.

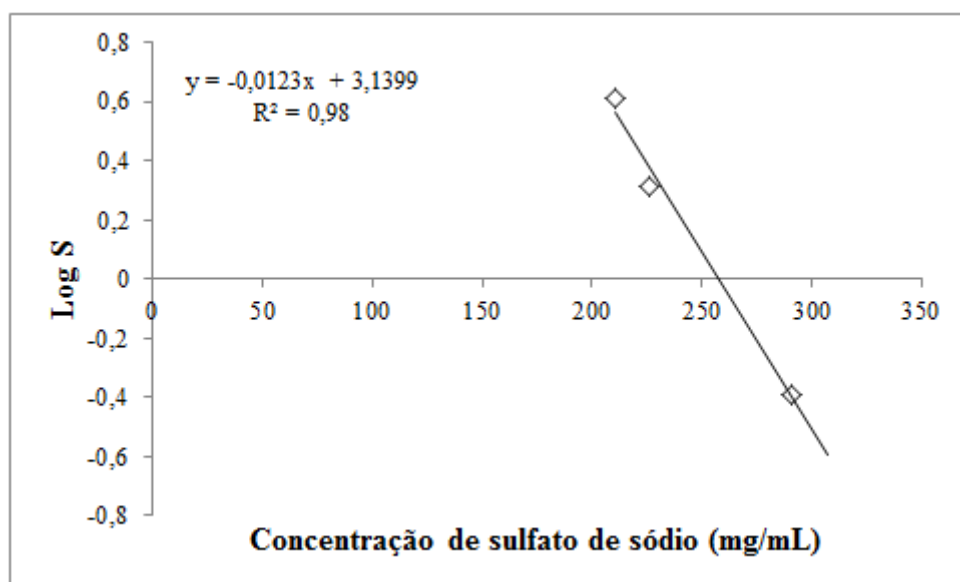


Figura A5- Linearização da equação de Cohn para o BSA em solução.

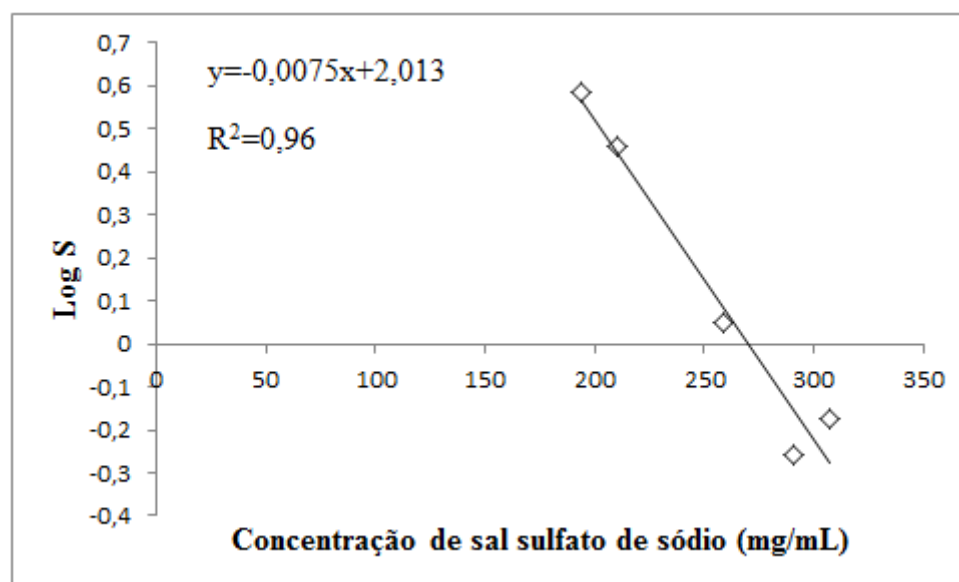


Figura A6- Linearização da Equação de Cohn para o BSA em pó.

Dados da Equação de Cohn para a Tripsina precipitada com carbamato de amônio

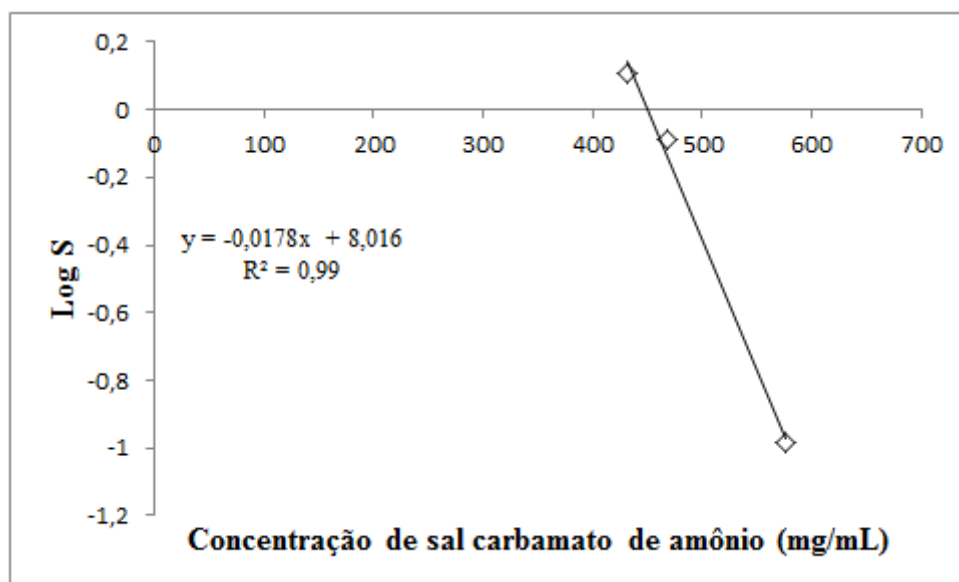


Figura A7- Linearização da equação de Cohn para Tripsina em pó.