



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

TIAGO SEVERO ESTRÁZULAS

**ABORDAGENS CROMATOGRÁFICAS PARA PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA NS1
NATIVA DO VÍRUS DA DENGUE SORO TIPO II (DENV-2)**

FORTALEZA

2018

TIAGO SEVERO ESTRÁZULAS

ABORDAGENS CROMATOGRÁFICAS PARA PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA NS1
NATIVA DO VÍRUS DA DENGUE SORO TIPO II (DENV-2)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, do Centro de Tecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química. Área de Concentração: Processos Químicos e Bioquímicos

Orientador: Prof. Dr. Ivanildo José da Silva Junior.

Coorientador: Prof. Dr. Maurício Fraga Van Tilburg

Coorientador: Dr. Diego Romão Gondim

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- E1a Estrázulas, Tiago Severo.
Abordagens cromatográficas para purificação da proteína NS1 nativa do vírus da dengue sorotipo II (DENV-2) / Tiago Severo Estrázulas. – 2018.
112 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2018.
Orientação: Prof. Dr. Ivanildo José da Silva Junior.
Coorientação: Prof. Dr. Maurício Fraga Van Tilburg.
1. Purificação de proteínas. 2. Proteína não estrutural NS1. 3. Perfil cromatográfico de adsorção. 4. Cromatografia de troca iônica. 5. Cromatografia de afinidade. I. Título.

CDD 660

TIAGO SEVERO ESTRÁZULAS

ABORDAGENS CROMATOGRÁFICAS PARA PURIFICAÇÃO DA NS1 NATIVA DO
DENV-2

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, do Centro de Tecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química. Área de Concentração: Processos Químicos e Bioquímicos

Aprovada em: 12/03/2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ivanildo José da Silva Junior (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Igor Tadeu Lazzarotto Bresolin
Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)

Profª. Dra. Danielle Ferreira de Oliveira
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Primeiramente a Deus.

A minha esposa Ticiany Alencar, aos meus pais,
irmãos, familiares e amigos que estiveram
comigo nesta caminhada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sempre me iluminar em meu caminho e me ceder toda a benção divina para superar os obstáculos e alcançar todos meus objetivos.

A minha Esposa Ticiany Alencar Cândido por ser uma excelente esposa e sempre estar ao meu lado em todos os momentos difíceis, sendo paciente comigo e sabendo me motivar mesmo quando eu não achava mais possível. Sempre serei muito grato por tudo que fez na minha vida e que sem o apoio dela eu não estaria aonde estou.

A minha família, em especial minha mãe Júlia Rosa Severo e meu pai Namur Iberê Estrázulas, que mesmo distantes sempre me apoiaram acima de tudo e acreditaram na minha pessoa.

Ao meu orientador prof. Dr. Ivanildo Jose da Silva Jr, que desde o início abriu as portas do laboratório LAPSEC para eu trabalhar e me proporcionando todos os recursos para atingir os objetivos do meu trabalho. Agradeço também, por em todos os momentos demonstrar muita confiança em mim, além de sempre estar presente em todos os momentos que tive alguma dificuldade na pesquisa.

Aos meus coorientadores Prof. Dr. Maurício Van Tilburg e Dr. Diego Romão Gondim que além de meus amigos, sempre me ajudaram em todos os momentos de dificuldade e nunca deixaram faltar apoio para execução da pesquisa. O Prof. Dr. Maurício sempre disposto em não deixar faltar nada para que a pesquisa avançasse e proporcionou ideias nos momentos difíceis que proporcionaram alcançar resultados significativos. Ao Dr. Diego por desde o início me ensinar tudo que sabe e sempre esteve ao meu lado na execução de todas as análises, me proporcionando aprendizados tanto profissionalmente, quanto pessoalmente, sendo esses que levarei para minha vida toda, bem como, me deu inúmeros conselhos de como conduzir com eficiência minha pesquisa. Sempre serei muito grato aos dois por tudo que fizeram por mim.

A Profa. Dra. Maria Izabel Florindo Guedes da Universidade Estadual do Ceará – UECE, que abriu as portas do Laboratório LBBM e possibilitou que eu pudesse executar grande parte da minha pesquisa com total apoio de seus orientandos. Entre seus orientandos, agradecimento ao Doutorando Bruno que ajudou muito para que os resultados fossem obtidos.

A Profa. Dra. Danielle Ferreira de Oliveira que sempre me auxiliou desde o início nas dúvidas sobre as análises, bem como, no apoio para execução dos meus resultados. Junto ao Prof. Dr. Maurício, sempre ajudou na produção da matéria-prima deste projeto. Gostaria de

agradecer também ter aceito o convite de contribuir no engrandecimento desse trabalho.

A Dra Jouciane de Sousa Silva e ao Prof. Dr. Igor Tadeu Lazzarotto Bresolin por terem aceitado o convite em dar sua contribuição para o engrandecimento desse trabalho.

Aos laboratórios parceiros que contribuíram de alguma maneira para obtenção de importantes resultados: GPBio, LPACO₂, NPL e LBBM (UECE).

A Família LAPSEC, do laboratório em que tive a honra de pertencer no meu Mestrado, onde pude compartilhar ótimos momentos de sabedoria, aprendizados e amizades com todos vocês: Diego, Paula, Luno, Burnier, Larissa, Darlyson, Érika, Santis, Isa, De Assis, Natália e Jéssica.

Aos meus amigos da pós-graduação, José Romero, Rafael Morales, Layane, Ailton, Fernanda.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo.

RESUMO

O vírus Dengue (DENV) é um arbovírus, da família *Flaviviridae* e apresenta quatro sorotipos virais, diferentes, tais como, DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4. O vírus codifica sete proteínas não estruturais, responsáveis pela replicação do vírus dentro do hospedeiro. Dentre elas, a proteína não estrutural (NS1), possui importância quanto ao diagnóstico precoce da infecção do vírus no organismo de pacientes infectados, uma vez que, esta circula em níveis elevados no sangue durante a fase aguda da doença. O DENV é responsável por uma variedade de manifestações clínicas em diversas partes do mundo e na atualidade infectou em torno de 100 milhões de pessoas. Entretanto, são encontrados vários obstáculos sobre a identificação correta dos sintomas do vírus e seu diagnóstico precoce. Assim, o presente trabalho buscou obter uma alta pureza na forma nativa do vírus através de um protocolo cromatográfico para purificação da proteína não estrutural NS1 nativa do vírus da Dengue sorotipo II oriundas de meio de cultivo de células infectadas (Células Vero). Ao todo foram produzidos sete meios de cultura, com volumes e concentrações diferentes. Devido a baixa concentração inicial dessas amostras, foram realizadas etapas de concentração da amostra, com filtração em membranas e liofilização. Para estudos de purificação da proteína NS1, foram utilizadas técnicas cromatográficas de troca iônica, com coluna Hitrap QFF e cromatografia de afinidade com coluna Hitrap Concanavalina A e corante Procion Red MX-5B imobilizado a matriz de Quitosana Alginato Epoxidado (QAE), atuando como matriz de afinidade pseudobioespecífica. O melhor perfil de adsorção da NS1 foi obtido com o uso de colunas de afinidade, devido sua maior especificidade com a proteína de interesse e os ensaios realizados com a coluna Hitrap Concanavalina A e com o corante PR-MX5B-QAE, apresentaram uma maior retenção da NS1, com remoção parcial de proteínas presentes na amostra bruta inicial. Estudos realizados com cromatografia de troca iônica, para adsorção desta proteína, identificaram os melhores resultados de adsorção nos ensaios com a amostra A2 de NS1-DENV2, em Gradiente degrau 35 min (presença de 6 amostras contendo a NS1 na etapa de eluição – cerca de 50% das amostras eluídas da coluna) e linear 30 min (presença de 5 amostras contendo a NS1 – cerca de 40% das amostras eluídas). Entretanto, as condições utilizadas favoreceram a adsorção de praticamente todas as proteínas presentes na amostra inicial, como por exemplo, a albumina.

Palavras-chave: Purificação de proteínas. Proteína não estrutural NS1. Perfil cromatográfico de adsorção.. Cromatografia de troca iônica Cromatografia de afinidade.

ABSTRACT

Dengue virus (DENV) is an arbovirus of the Flaviviridae family and has four different viral serotypes, such as DENV-1, DENV-2, DENV-3 and DENV-4. The virus codes for seven non-structural proteins responsible for virus replication within the host. Among them, the nonstructural protein (NS1), is important in the early diagnosis of virus infection in the body of infected patients, since it circulates in high blood levels during the acute phase of the disease. DENV is responsible for a variety of clinical manifestations in various parts of the world and currently infects around 100 million people. However, several obstacles are encountered regarding the correct identification of virus symptoms and their early diagnosis. Thus, the present work sought to obtain a high purity in the native form of the virus through a chromatographic protocol for purification of the NS1 nonstructural protein native to the Dengue serotype II virus originating from the culture medium of infected cells (Vero cells). In all, seven culture media were produced, with different volumes and concentrations. Due to the low initial concentration of these samples, sample concentration steps were carried out with membrane filtration and lyophilization. For NS1 purification studies, ion exchange chromatography techniques were used, with Hitrap QFF column and Hitrap Concanavalin A column affinity chromatography and Procion Red MX-5B dye immobilized the Chitosan Alginate Epoxidate (QAE) matrix, acting as matrix of pseudobiospecific affinity. The best adsorption profile of NS1 was obtained with the use of affinity columns, due to their higher specificity with the protein of interest and the tests performed with the Hitrap Concanavalin A column and the PR-MX5B-QAE dye showed a higher retention of NS1, with partial removal of proteins present in the initial crude sample. For the adsorption of this protein, the best adsorption results were found in the NS1-DENV2 A2 sample, in the gradient gradient 35 min (presence of 6 samples containing the NS1 in the elution step - about 50% of samples eluted from the column) and linear 30 min (presence of 5 samples containing NS1 - about 40% of the samples eluted). However, the conditions favored the adsorption of almost all the proteins present in the initial sample, such as albumin.

Keywords: Protein purification. Non-structural protein – NS1. Adsorption chromatographic profile. Ion exchange chromatography. Affinity chromatography.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Organização genômica do vírus da dengue.....	19
Figura 2	Morfologia do Vírus - Vírus Envolopado.....	20
Figura 3	Etapas de Adsorção, Lavagem e Eluição na Cromatografia de Afinidade.....	25
Figura 4	Mecanismo de separação por troca iônica.....	31
Figura 5	Matriz com trocadores aniônicos e catiônicos.....	31
Figura 6	Fluxograma do processo de purificação da NS1-DENV2.....	34
Figura 7	Visualização do Sistema Contichrom – FPLC.....	40
Figura 8	Elektroforese das amostras de NS1-DENV2 coletadas em meio de cultura (Célula Vero) – Descrição dos poços: Padrão de proteínas de baixo peso molecular – P; Amostras de NS1- DENV2: A1, A2, A3, A4, A5, A6 e A7; Padrão de Proteína BSA – A.....	43
Figura 9	Elektroforese das amostras após as centrifugações com os tubos de amicon 30 e 50 kDa – Amostra analisada com NS1 sem SFB. Descrição dos poços: Padrão de proteínas de baixo peso molecular – P; Amostra bruta A1 de NS1-DENV2 – I; Amostras retidas no tubo Amicon de 50 kDa - M50, Amostras que passaram pelo tubo Amicon 50 kDa – m50; Amostras retidas no tubo Amicon de 30 kDa - m50-30, Amostras que passaram pelo tubo Amicon 30 kDa – m30, Padrão de Proteína IgG – IgG.....	47
Figura 10	Elektroforese das amostras após as centrifugações com os tubos de amicon 30 e 50 KDa – Amostra analisada com NS1 2% SFB. Descrição dos poços: Padrão de proteínas de baixo peso molecular – P; Amostra Inicial sem SFB – Inicial – I; Amostras retidas no tubo Amicon de 50 kDa - M50, Amostras retidas no tubo Amicon de 30 kDa – M30; Amostras que passaram pelo tubo Amicon 50 KDa – m50; Amostras que passaram pelo tubo Amicon 30 kDa – m30, Padrão de Proteína – Albumina – A.....	50
Figura 11	Descrição dos Dot-Blots visíveis na Membrana M-A-I, Letras: (C+) Controle Positivo – Presença de NS1 Recombinante; (C-) Controle Negativo – Sobrenadante L-15 sem a presença de NS1; (A) Amostra bruta inicial A1 de NS1-DENV2; (B) Amostra A1 retida no filtro de 50 kDa [M50 (2)]; (C) Amostra A1 retida no filtro de 50 kDa [M50(4)]; (D)	

Amostra A1 que passou do filtro de 50 kDa [m50(4)]; (E) Amostra A1 que passou na 1º Centrifugação do filtro de 50 kDa [m50(1)] e ficou retida no filtro de 30 kDa [M50-30(1)]; (F) Amostra A1 que passou na 4º Centrifugação do filtro de 50 kDa [m50(4)] e ficou retida no filtro de 30 kDa [M50-30(4)]; (G) Amostra A2 retida no filtro de 50 kDa [M50 (1)]; (H) Amostra A2 retida no filtro de 50 kDa [M50 (2)]; (I) Amostra A2 que passou na 1º Centrifugação do filtro de 50 kDa [m50(1)] e ficou retida no filtro de 30 kDa [M50-30(1)]; (J) Amostra A1 que passou na 2º Centrifugação do filtro de 50 kDa [m50(4)] e ficou retida no filtro de 30 kDa [M50-30(2)]; (K) Amostra Bruta inicial A2 de NS1-DENV2; Proteína de Referência Albumina – 53

A.....

Figura 12 (A) Gradiente degrau 35 min – Amostra A2 – NS1 DENV2. Condições de corrida: vazão de 0,8 mL/min, injeção de 1,0 mL da amostra com concentração de 0,63 mg/mL diluída em tampão Tris/HCl pH 8,0 e eluição com tampão de Tris/HCl pH 8,0 + 1M NaCl. (B) SDS-PAGE 10% – Gradiente degrau 35 min. Descrição dos poços da eletroforese: Padrão de baixo peso molecular – P, Amostra Inicial – I, Amostras 1 e 10 (Lavagem), 11 à 13 (1ª Etapa gradiente degrau – 0,10 – 0,15 M de NaCl), 14 à 15 (2ª Etapa – 0,15 – 0,20 M de NaCl), 22 à 25 (4ª Etapa – 0,5 – 1M de NaCl), 26 (5ª Etapa – 1M de NaCl), 35 a 37 (Regeneração – 1M de NaOH), Proteína de Referência Albumina – 56

A.....

Figura 13 (A) Dot-Blot - Descrição: amostras 14, 15, 28, 29, 30 e 31, indicando as que marcaram a presença de NS1 de acordo com a membrana utilizada na técnica de Dot Blot (M-A-I e M-A-II). (B) SDS-PAGE 10% – Amostras que marcaram NS1. Descrição dos poços da eletroforese: Padrão de baixo peso molecular – P, Amostra Inicial – I, Amostras 14 a 15 (2ª Etapa – 0,15 – 0,20 M de NaCl), 28 a 30 (4ª Etapa – 0,5 – 1M de NaCl), 31 (5ª Etapa – 1M de NaCl), Proteína de Referência Albumina – A..... 57

Figura 14 (A) Gradiente Linear 30 min – Amostra A2 – NS1 DENV2 diluída 2x. Condições de corrida: vazão de 0,8 mL/min, injeção de 1,0 mL da amostra com concentração de 0,63 mg/mL diluída em tampão Tris/HCl pH 8,0 e e

	<p>eluição com tampão de Tris/HCl pH 8,0 + 1M NaCl. (B) SDS-PAGE 10% – Gradiente linear 30 min. Descrição dos poços: Padrão de baixo peso molecular – P, Amostra Inicial – I, Amostras 38 e 42 (Lavagem), 43 á 52 (1° Pico – Eluição), 53 à 57 (2° Pico – Eluição), 58 à 62 (3° Pico – Eluição), 65 e 66 (Regeneração – 1M de NaOH), Proteína de Referência Albumina – A.....</p>	59
Figura 15	<p>(A) Dot-Blot - Descrição: amostras 41, 43, 53, 54 e 55, indicando as que marcaram a presença de NS1 de acordo com a membrana utilizada na técnica de Dot Blot (M-A-II). (B) SDS-PAGE 10% – Amostras que marcaram NS1. Descrição dos poços: Padrão de baixo peso molecular – P, Amostra Inicial – I, Amostras 41 e 43 (1° Pico – Eluição), 53 a 55 (2° Pico – Eluição), Proteína de Referência Albumina – A.....</p>	61
Figura 16	<p>(A) Gradiente degrau 32 min – Amostra A2 – NS1 DENV2. Condições de corrida: vazão de 0,8 mL/min, injeção de 1,0 mL da amostra com concentração de 0,63 mg/mL diluída em tampão Tris/HCl pH 8,0 e eluição com tampão de Tris/HCl pH 8,0 + 1M NaCl. (B) SDS-PAGE 10% – Gradiente degrau 32 min. Descrição dos poços da eletroforese: Padrão de baixo peso molecular – P, Amostra Inicial – I, Amostras 67 e 70 (Lavagem), 73 á 75 (1ª Etapa gradiente degrau – 0,15 – 0,20 M de NaCl), 80 e 81 (3ª Etapa – 0,5 – 1 M de NaCl), 82 e 83 (4ª Etapa – 1M de NaCl), 87 a 89 (Regeneração – 1M de NaOH), Proteína de Referência Albumina – A.....</p>	62
Figura 17	<p>(A) Dot-Blot – (C+) Controle Positivo – Presença de NS1 Recombinante; (C-) Controle Negativo – Sobrenadante L-15 sem a presença de NS1; Descrição: amostra 73, indicando a presença de NS1 de acordo com a segunda membrana utilizada na técnica de Dot Blot (M-B-II).(B) SDS-PAGE 10% – Amostra que marcou NS1. Descrição dos poços da eletroforese: Padrão de baixo peso molecular – P, Amostra Inicial – I, Amostra 73 (1ª Etapa – 0,15 – 0,20 M de NaCl, Proteína de Referência Albumina – A.....</p>	64
Figura 18	<p>(A) Gradiente degrau 32 min – Amostra A1 [M50 (1-5)] – NS1 DENV2 diluída 2x. Condições de corrida: vazão de 0,8 mL/min, injeção de 1,0 mL da amostra com concentração de 0,35 mg/mL diluída em tampão Tris/HCl</p>	

	pH 8,0 e eluição com tampão de Tris/HCl pH 8,0 + 1M NaCl. (B) SDS-PAGE 10%. Descrição dos poços da eletroforese: Padrão de baixo peso molecular – P, Amostra Inicial – I, Amostras 4 a 16 (Lavagem), 17 a 25 (1ª Etapa gradiente degrau – 0,15 – 0,20 M de NaCl), 27 a 29 (3ª Etapa 0,5 – 1 M de NaCl), 30 a 34 (4ª Etapa – 1M de NaCl), 35 (Regeneração – 1M de NaOH), Proteína de Referência Albumina – A.....	66
Figura 19	(A) Descrição: amostras 5, 6, 19, 20 e 28, indicando a presença de NS1 de acordo com a membrana utilizada na técnica de Dot Blot (M-B-I e M-B-II). (B) SDS-PAGE 10% – Amostra que marcou NS1. Descrição dos poços da eletroforese: Padrão de baixo peso molecular – P, Amostra Inicial – I, Amostra 5 e 6 (Lavagem), 19 e 20 (1ª Etapa – 0,15 – 0,20 M de NaCl), 28 (3ª Etapa – 0,5 – 1M de NaCl), Proteína de Referência Albumina – A.....	68
Figura 20	(A) Gradiente degrau 35 min – Amostra A1 [M50 (1-5)] – NS1 DENV2 diluída 2x. Condições de corrida: vazão de 0,8 mL/min, injeção de 1,0 mL da amostra com concentração de 0,35 mg/mL diluída em tampão Tris/HCl pH 8,0 e eluição com tampão de Tris/HCl pH 8,0 + 1M NaCl. (B) SDS-PAGE 10%. Descrição: Padrão de baixo peso molecular – P, Amostra Inicial – I, Amostras 37 a 50 (Lavagem), 51 a 54 (1ª Etapa gradiente degrau – 0,10 – 0,15 M de NaCl), 55 e 56 (2ª Etapa 0,15 – 0,20 M de NaCl), 57 a 59 (4ª Etapa – 0,5 – 1 M de NaCl), 60 a 62 (5ª Etapa – 1 M de NaCl), 65 (Regeneração – 1M de NaOH), Proteína de Referência Albumina – A.....	70
Figura 21	(A) Descrição: amostras 36 e 38, indicando a presença de NS1 de acordo com a membrana utilizada na técnica de Dot Blot (M-B-II). (B) SDS-PAGE 10% – Amostra que marcou NS1. Descrição: Padrão de baixo peso molecular – P, Amostra Inicial – I, Amostra 36 e 38 (Lavagem), Proteína de Referência Albumina – A.....	72
Figura 22	(A) Gradiente Linear 30 min – Amostra A3 – NS1 DENV2 diluída 5x. Condições de corrida: vazão de 0,8 mL/min, injeção de 1,0 mL da amostra com concentração de 0,44 mg/mL diluída em tampão Fosfato pH 5,9 25 mM e eluição com tampão de Tris/HCl pH 8,0 + 1M NaCl. (B) SDS-PAGE 10% – Gradiente Linear 30 min – Concentração de 0,44 mg/mL. Descrição dos poços da eletroforese: Padrão de baixo peso molecular – P, Amostra	

	Inicial – I, Amostras 1 a 12 (1° Pico - Lavagem), 15 a 23 (Lavagem, após 13:40 min), 34 a 38 (Pico – Eluição), 39 a 42 (Eluição, após 44:30 min), Proteína de Referência Albumina – A.....	75
Figura 23	(A) Descrição: amostras 7, 8, 27, 29, 30 e 40, indicando as proteínas que marcaram a presença de NS1 de acordo com a membrana utilizada na técnica de Dot Blot (M-C-I e M-C-II). (B) SDS-PAGE 10% – Amostra que marcou NS1. Descrição: Padrão de baixo peso molecular – P, Amostra Inicial – I, Amostra 7 e 8 (Pico - Lavagem), 27 a 30 (Pico – Eluição), 40 (Eluição, após 48:30 min), Proteína de Referência Albumina – A.....	77
Figura 24	(A) Amostra A5 de NS1-DENV2 diluída 2x – 1° Ensaio – Corante Procion Red MX-5B – Eluição isocrática 30 min - vazão de 1 mL/min, injeção de 1,0 mL da amostra com concentração de 0,35 mg/mL diluída em tampão Fosfato de Sódio pH 5,9 e eluição com tampão Fosfato de Sódio pH 5,9 + 1M de NaCl. (B) SDS-PAGE 10% – Eluição isocrática 30 min – Concentração de 0,35 mg/mL. Descrição dos poços da eletroforese: Padrão de baixo peso molecular – P, Amostra Inicial – I (A5 de NS1-DENV2), Amostras 9 a 15 (Lavagem), 32 a 36 (Eluição – 32-36 min), 44 a 50 (Eluição – 44-50 min), 51 a 53 (Final Eluição – 51-53 min), 56 a 58 (Re-Equilíbrio), Proteína de Referência Albumina – A.....	79
Figura 25	(A) Descrição dos Dot-Blots visíveis na Membrana M-D-I, Letras: (C+) Controle Positivo – Presença de NS1 Recombinante; (C-) Controle Negativo – Sobrenadante L-15 sem a presença de NS1, Amostras 1° Ensaio com Corante PR-MX5B-QAE – Eluição isocrática 30 min - Amostras que marcaram NS1: Amostras 29 a 36 referentes a etapa de eluição isocrática coletadas a parti de 29 min. (B) SDS-PAGE 10% – Eluição isocrática 30 min – Concentração de 0,35 mg/mL. Descrição dos poços da eletroforese: Padrão de baixo peso molecular – P, Amostra Inicial – I (A5 de NS1-DENV2), Amostras 29 a 31 (Eluição – 29-31 min), 36 e 37 (Eluição – 36-37 min), Proteína de Referência Albumina – A.....	81
Figura 26	(A) Amostra A5 de NS1-DENV2 diluída 2x – 2° Ensaio – Corante Procion	

Red MX-5B – Eluição isocrática 30 min - vazão de 1 mL/min, injeção de 1,0 mL da amostra com concentração de 0,35 mg/mL diluída em tampão Fosfato de Sódio pH 5,9 e eluição com tampão Fosfato de Sódio pH 5,9 + 1M de NaCl. (B) SDS-PAGE 10% – Eluição isocrática 30 min – Concentração de 0,35 mg/mL. Descrição dos poços da eletroforese: Padrão de baixo peso molecular – P, Amostra Inicial – I (A5 de NS1-DENV2), Amostras 10 a 16 (Lavagem), 32 a 38 (Eluição – 32-38 min), 47 a 54 (Final Eluição – 47-54 min), Proteína de Referência Albumina – A..... 83

Figura 27 (A) Descrição dos Dot-Blots visíveis na Membrana M-D-II, Letras: (E2) – Amostras do 2º Ensaio com Corante PR-MX5B-QAE – Eluição isocrática 30 min - que marcaram NS1: Amostras 31, 53, 54 referentes a etapa de eluição isocrática coletadas a parti de 31 min. (B) SDS-PAGE 10% – Eluição isocrática 30 min – Concentração de 0,35 mg/mL. Descrição dos poços da eletroforese: Padrão de baixo peso molecular – P, Amostra Inicial – I (A5 de NS1-DENV2), Amostras 31 (Eluição – após 31 min), 53 (Eluição – após 53 min), Proteína de Referência Albumina – A..... 85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação das resinas de acordo com os grupos funcionais fixados à matriz.....	33
Tabela 2	Dados Centrifugação Tubo Amicon 30 e 50 kDa.....	38
Tabela 3	Quantificação da amostra inicial por Bradford.....	41
Tabela 4	Dados obtidos na etapa de liofilização das amostras brutas de NS1-DENV2..	44
Tabela 5	Dados Coletados nas centrifugações – Tubo Amicon 50 kDa – Concentração inicial de 0,35 mg/mL.....	45
Tabela 6	Dados Coletados nas Centrifugações – Tubo Amicon 30 kDa – Concentração inicial de 0,15 mg/mL.....	46
Tabela 7	Amostras obtidas na centrifugação do Tubo Amicon de 50 kDa.....	49
Tabela 8	Amostras obtidas na centrifugação do Tubo Amicon de 30 kDa.....	50
Tabela 9	Dados da amostra diluída 2x de NS1 - DENV2.....	54
Tabela 10	Balanço de massa por etapa - Gradiente Degrau 35 min - A2-NS1-DENV2..	56
Tabela 11	Balanço de massa por etapa - Gradiente Linear 30 min - A2-NS1-DENV2....	59
Tabela 12	Balanço de massa por etapa - Gradiente Degru 32 min - A2-NS1-DENV2....	63
Tabela 13	Balanço de massa por etapa - Gradiente Degru 32 min – A1 [M50 (1-5)] de NS1-DENV2.....	67
Tabela 14	Balanço de massa por etapa - Gradiente Degru 35 min – A1 [M50 (1-5)] de NS1-DENV2.....	70
Tabela 15	Dados das amostras diluídas de NS1 - DENV2.....	74
Tabela 16	Balanço de massa por etapa - Gradiente Linear 30 min – A3 de NS1- DENV2.....	76
Tabela 17	Balanço de massa por etapa – Eluição Isocrática 30 min – A5 de NS1- DENV2 – 1º Ensaio.....	80
Tabela 18	Balanço de massa por etapa – Eluição Isocrática 30 min – A5 de NS1- DENV2 – 2º Ensaio.....	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
A(n)	Amostra bruta de NS1 coletada em meio de cultivo celular infectado (1-7)
C	Proteína Estrutural do Capsídeo
CTI	Cromatografia de Troca Iônica
CA	Cromatografia de Afinidade
E	Proteína Estrutural do Envelope
DENV	Vírus da Dengue
DENV1	Vírus da Dengue do tipo 1
DENV2	Vírus da Dengue do tipo 2
DENV3	Vírus da Dengue do tipo 3
DENV4	Vírus da Dengue do tipo 4
DVB	Divinilbenzeno
FD	Febre Clássica Dengue
FHD	Febre Hemorrágica Dengue
IgG	Imunoglobulina da Classe G
IgM	Imunoglobulina da Classe M
NS1	Proteína Não Estrutural 1
NS2	Proteína Não Estrutural 2
NS3	Proteína Não Estrutural 3
NS4	Proteína Não Estrutural 4
NS5	Proteína Não Estrutural 5
M	Proteína Estrutural da Membrana
M-A	Primeira Membrana de Nitrocelulose utilizado na técnica Dot-Blot (DB)
M-B	Segunda Membrana de Nitrocelulose utilizado na técnica Dot-Blot (DB)
M-C	Terceira Membrana de Nitrocelulose utilizado na técnica Dot-Blot (DB)
M-D	Quarta Membrana de Nitrocelulose utilizado na técnica Dot-Blot (DB)
M-A-I	Primeira parte da Membrana de Nitrocelulose M-A – Técnica Dot-Blot (DB)
M-A-II	Segunda parte da Membrana de Nitrocelulose M-A – Técnica Dot-Blot (DB)
M-B-I	Primeira parte da Membrana de Nitrocelulose M-B – Técnica Dot-Blot (DB)
M-B-II	Segunda parte da Membrana de Nitrocelulose M-B – Técnica Dot-Blot (DB)
M-C-I	Primeira parte da Membrana de Nitrocelulose M-C – Técnica Dot-Blot (DB)

M-C-II	Segunda parte da Membrana de Nitrocelulose M-C – Técnica Dot-Blot (DB)
M-D-I	Primeira parte da Membrana de Nitrocelulose M-D – Técnica Dot-Blot (DB)
M-D-II	Segunda parte da Membrana de Nitrocelulose M-D – Técnica Dot-Blot (DB)
M50	Amostra retida no filtro do Tubo Amicon de 50 kDa
m50	Amostra que passou do filtro do Tubo Amicon de 50 kDa
M50-30	Amostra que passou no Tubo de 50 kDa e ficou retida no filtro do Tubo Amicon de 30 kDa
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
prM	Forma imatura da Proteína Estrutural da Membrana
RE	Retículo Endoplasmático
RNA	Ácido Ribonucleico
RNC3'	Região Não Codificante 3'
RNC5'	Região Não Codificante 5'
SCD	Síndrome de Choque da Dengue

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
1.1	Objetivo Geral.....	15
1.2	Objetivos específicos.....	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1	Dengue.....	17
2.2	Vírus da Dengue e suas características.....	18
2.2.1	<i>Proteínas Estruturais.....</i>	20
2.2.2	<i>Proteínas não estruturais.....</i>	21
2.3	Importância da proteína não estrutural NS1.....	22
2.4	Técnicas Cromatográficas para Separação e/ou Purificação de Proteínas.....	24
2.4.1	<i>Cromatografia de Afinidade (CA).....</i>	24
2.4.1.1	<i>Matriz Cromatográfica.....</i>	26
2.4.1.2	<i>Ligante pseubioespecífico.....</i>	27
2.4.2	<i>Cromatografia de Troca Iônica (CTI).....</i>	28
2.4.2.1	<i>Mecanismo de separação por troca iônica.....</i>	29
2.4.2.2	<i>Classificação das resinas de troca iônica.....</i>	32
3	METODOLOGIA.....	34
3.1	Obtenção da proteína não estrutural NS1 do vírus do Dengue sorotipo II (DENV-2).....	34
3.2	Caracterização inicial da amostra bruta com a proteína NS1-DENV2.....	35
3.2.1	<i>Determinação de proteínas totais.....</i>	35
3.2.2	<i>Eletroforese (SDS-PAGE).....</i>	35
3.2.3	<i>Dot-Blot (DB).....</i>	36
3.3	Etapa de Dessanilização das Amostras Brutas de NS1-DENV2.....	37
3.4	Etapa de Concentração da Amostra Bruta de NS1-DENV2.....	37

3.4.1	<i>Tubo Amicon 30 e 50 kDa.....</i>	37
3.4.2	<i>Liofilização (concentração) das Amostras Brutas de NS1-DENV2.....</i>	38
3.5	<i>Estratégias de purificação da NS1-DENV2.....</i>	39
4	<i>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</i>	42
4.1	<i>Caracterização inicial da amostra bruta com a proteína NS1-DENV2</i>	42
4.1.1	<i>Determinação de proteínas totais.....</i>	42
4.1.2	<i>Eletroforese (SDS-PAGE) das amostras brutas de NS1-DENV2.....</i>	43
4.2	<i>Concentração e Quantificação das Proteínas Virais.....</i>	44
4.2.1	<i>Concentração da amostra bruta A1 utilizando Tubo Amicon 30 e 50 kDa.....</i>	45
4.2.1.1	<i>Centrifugação Tubo Amicon 15 mL com filtro de 50 kDa (A1-NS1-DENV2).....</i>	45
4.2.1.2	<i>Centrifugação Tubo Amicon 15 mL com filtro de 30 kDa.....</i>	46
4.2.2	<i>Concentração da amostra bruta A2 utilizando Tubo Amicon 30 e 50 kDa.....</i>	48
4.2.2.1	<i>Centrifugação Tubo Amicon 15 mL com filtro de 30 e 50 kDa (A2-NS1-DENV2) com variação do volume inicial.....</i>	49
4.2.3	<i>Técnica Dot-Blot (DB) das amostras coletadas – Tubo Amicon 30 e 50 kDa – Etapa de Concentração – Amostras A1 e A2 de NS1-DENV2.....</i>	52
4.3	<i>Estratégias de Purificação da NS1-DENV2 em colunas de leito fixo convencionais.....</i>	54
4.3.1	<i>Purificação por cromatografia de troca iônica (CTI)</i>	54
4.3.1.1	<i>Amostra A2 – NS1-DENV2 – Hitrap QFF – Gradiente Degrau 35 min.....</i>	55
4.3.1.2	<i>Amostra A2 – NS1-DENV2 – Hitrap QFF – Gradiente Linear 30 min.....</i>	59
4.3.1.3	<i>Amostra A2 – NS1-DENV2 – Hitrap QFF – Gradiente Degrau 32 min.....</i>	61
4.3.1.4	<i>Amostra A1 [M50 (1-5)] – NS1-DENV2 – Hitrap QFF – Gradiente Degrau 32 min.....</i>	65
4.3.1.5	<i>Amostra A1 [M50 (1-5)] – NS1-DENV2 – Hitrap QFF – Gradiente Degrau 35 min.....</i>	69
4.3.2	<i>Purificação por cromatografia de afinidade (CA).....</i>	73
4.3.2.1	<i>Amostra A3 - NS1-DENV2 - Hitrap Concanavalina A - Gradiente Linear 30 min - Sistema FPLC – Contichrom.....</i>	74

4.3.2.2	<i>Amostra A5 – NS1-DENV2 – Procion Red MX-5B – Eluição Isocrática 30 min – Coluna C10/10 – Sistema de leito fixo convencional – Primeiro Ensaio.....</i>	78
4.3.2.3	<i>Amostra A5 – NS1-DENV2 – Procion Red MX-5B – Eluição Isocrática 30 min – Coluna C10/10 – Sistema de leito fixo convencional – Segundo Ensaio.....</i>	82
5	CONCLUSÕES.....	87
	REFERÊNCIAS.....	89
	ANEXO A – MEMBRANAS UTILIZADAS NA TÉCNICA DOT-BLOT (DB).....	100

1 INTRODUÇÃO

Existem uma variedade de doenças causadas por arbovírus (vírus transmitidos por insetos e aracnídeos), que podem causar doenças em humanos, tais como as arboviroses do tipo Dengue, Zika e Chikungunya. Estes tipos virais são transmitidos por mosquitos em maior parte dos casos e incluem vírus dos gêneros flavivírus, alphavírus e bunyavírus (CIOTA; KRAMER, 2010). Neste cenário, o mosquito *Aedes aegypti* e *Aedes Albopictus* é um vetor competente, responsável por diversas arboviroses, que surgiram no Brasil e entre outros países do continente americano causando epidemias.

Entre os arboviroses transmitidas pelo vetor, a infecção pelo vírus da dengue (DENV), transmite uma doença sem contágio, porém, infecciosa. A DENV infectou em torno de 100 milhões de pessoas no mundo, onde 500 mil pessoas apresentaram os dois estágios mais avançados da doença: a febre hemorrágica da dengue (FHD) e a síndrome de choque da dengue (SCD). Ambos os efeitos dessas doenças se iniciam de maneira súbita acompanhados de febre alta, dor de cabeça, dor atrás dos olhos, dores nas costas (WHO, 2016).

Neste contexto o DENV apresenta quatro sorotipos virais, diferentes, tais como, DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, que podem ocasionar a forma clássica da doença e a mais grave como a Dengue Hemorrágica (MUSSO; GUBLER, 2016 e WESTAWAY *et al.*, 1987).

Cada partícula do vírus consiste de um genoma viral com uma fita simples de RNA com polaridade positiva com aproximadamente 11 mil pares de base. O genoma codifica uma poliproteína que é dividida em três proteínas estruturas (E, M e C) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5). As proteínas estruturais que são responsáveis por proteger o RNA viral são, a proteína do capsídeo (C), a membrana (M), e a proteína do envelope (E). Enquanto que, as proteínas não estruturais são responsáveis pela replicação do vírus (LINDENBACH, *et al.*, 2007; HAHN *et al.*, 1988).

A proteína não estrutural, NS1 é codificada pelo genoma viral e pode ser encontrada em duas formas (monômero e dímero). Esta proteína pode ser expressa em sua forma solúvel que passa a ser secretada para o sangue pelas células infecciosas. Entre as formas de expressão da proteína, existem meios de cultivo de células vegetais e de mamíferos (Vero e C6/36), bactérias e plantas. A forma secretada da proteína NS1 pode ser utilizada para a produção de anticorpos mono e policlonais através da sua purificação e posterior imunização, cuja atividade desses anticorpos geram proteção ao vírus (CHANG, 1997; COSTA; FREIRE; ALVES, 2006). Esta proteína está relacionada com a patogenicidade da infecção e, mais

recentemente, vem sendo utilizada como marcador precoce da infecção por DENV, visto a possibilidade de identificação quanto à presença de NS1 no soro de pacientes infectados, uma vez que, esta proteína circula em níveis elevados no sangue durante a fase aguda da doença. (STOHLMAN et al., 1975 e WESTAWAY et al., 1987).

Existem estudos que apontam a eficiência na purificação da NS1, obtida de forma recombinante, devido a adição de uma cauda de histina, na estrutura molecular da proteína, a qual é utilizada para facilitar a sua purificação. A forma recombinante da proteína NS1, ocorre em sistemas de expressão em bactérias, utilizando organismos procariotos, como a *Escherichia coli* que é amplamente utilizada neste tipo sistema de expressão, devido ao baixo custo e à facilidade de manipulação (GAGNON, *et al.*, 2012; YOHAN, *et al.*, 2016 e AMORIN, *et al.*, 2010).

Através deste tipo de expressão, foi possível utilizar técnicas de purificação com cromatografia de afinidade com metais, devido a especificidade que esta coluna possui com a cauda de histidina, bem como a utilização de duas etapas de purificação, sendo utilizada primeiramente uma coluna de imunoafinidade, seguida por uma coluna de troca iônica (AMORIN, *et al.* 2010 e FALCONAR e YOUNG, 1990).

Entretanto, em expressão por bactérias, os mecanismos não são capazes de realizar modificações pós-traducionais os quais estão presentes em organismos superiores, o que dificulta a eficiência quanto a produção de proteínas recombinantes semelhantes à forma selvagem (nativa do vírus) devido à sua simplicidade, uma vez que, o arranjo conformacional do epítipo do vírus sintetizado não é semelhante ao epítipo do vírus nativo, afetando desta forma a produção de anticorpos que são gerados pela resposta imune, posterior a imunização do vírus no organismo. (KAMIONKA, 2011).

Diante disso, busca-se obter a proteína NS1 nativa do DENV, para que se possam produzir anticorpos específico para um único epítipo, ou mistura de anticorpos, cada um específico para um epítipo, de tal forma, que reajam de forma específica com o vírus DENV, para realização de diagnósticos mais eficazes da doença.

1.1 Objetivo geral

Determinar um protocolo cromatográfico para purificação da proteína não estrutural NS1 nativa do vírus da Dengue sorotipo II (DENV-2) oriunda de meio de cultivo de células infectadas de forma rápida e eficaz.

1.2 Objetivos Específicos

- a) Identificar o perfil cromatográfico de retenção de NS1 do vírus (DENV-2) utilizando cromatografia de troca iônica, com coluna aniônica Hitrap QFF;
- b) Realizar a pré-purificação das amostras iniciais utilizando filtração em membranas e liofilização;
- c) Identificar o perfil cromatográfico de adsorção de NS1 do vírus nativo (DENV-2) utilizando cromatografia de afinidade com colunas comerciais (Hitrap Concanavalina A – Ligante biospecífico) e coluna sintetizada (Corante Procion Red MX-5B ligado a matriz de Quitosana Alginato Epoxidado – QAE);
- d) Confirmar a presença da proteína NS1 nos ensaios cromatográficos a partir de técnicas analíticas como eletroforese (SDS-PAGE) e Dot-Blot (DB).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Dengue

A dengue é considerada uma doença sem contágio, porém, infecciosa ocasionada pelo DENV, o qual é transmitido pela fêmea da espécie *Aedes aegypti* através da sua saliva. Este vírus foi isolado na década de 40, em um primeiro momento, pelo cientista Susumo Hotta, após o aparecimento de uma epidemia na região de Nagasaki, no Japão. Contudo, há relatos de seu surgimento por volta do século 17 de acordo com a organização mundial da saúde (OMS), onde esta doença passou a ser reconhecida como uma entidade clínica (KIMURA, HOTTA, 1944; WHO, 2016).

O DENV, pode ser transmitido por mosquitos como: *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Aedes polynesiensis* e *Aedes africanus*, sendo o *Aedes aegypti* o principal responsável na transmissão do DENV. Os vetores do DENV estão localizados majoritariamente, em regiões tropicais e sub-tropicais, pois apresentam climas favoráveis para o desenvolvimento do mosquito. Tanto ambientes urbanos, quanto rurais há o aparecimento da doença (PERICH *et al.*, 2000; EFFLER *et al.*, 2005; WHO, 2016).

No ano de 2008 foi relatado que o DENV, 500 mil pessoas apresentaram os dois estágios mais avançados da doença: a febre hemorrágica da dengue e a síndrome de choque da dengue. Ambos os efeitos da infecção se iniciam de maneira súbita acompanhados de febre alta, dor de cabeça, dor atrás dos olhos, dores nas costas. Nos piores estágios da doença, os quais se iniciam com os mesmos sintomas da forma clássica, após o quinto dia de incubação do vírus há o surgimento de sangramentos e choque por parte de alguns pacientes (OISHI *et al.*, 2007; PERERA e KUHN, 2008).

Após a infecção do DENV no organismo humano, não é possível prever quais são os estágios da doença (forma leve ou evolução para forma grave da doença, SCD/FHD) que se desenvolverão no indivíduo infectado. O aparecimento das formas mais graves da doença pode estar relacionado com a maior infestação do vetor *Aedes aegypti*, a presença dos quatro sorotipos do virais, possibilidade de uma infecção secundária do hospedeiro, elevada imigração de pessoas e elevadas densidades populacionais e o intenso deslocamento geográfico das pessoas (HALSTEAD, 1981).

Os primeiros casos da DENV em território brasileiro ocorreram nos estados de São Paulo (1850-1855) e no Rio de Janeiro (1917-1925). As maiorias dos casos de doenças estavam relacionadas com a presença da febre amarela e do DENV na metade do século XIX. Dadas essas circunstâncias foram necessários programas de combate, a esta doença causada

pelo vetor *Aedes aegypti*, sendo que ambas foram totalmente combatidas até o final dos anos 70 (WHO, 2016).

O DENV ressurgiu no Brasil, na década 80 a partir da entrada de imigrantes de países vizinhos. A partir daí estados como Roraima, Rio de Janeiro, Ceará, Bahia, Minas Gerais e São Paulo, apresentaram surtos da doença entre os anos de 1981 até 1987. Com a disseminação da doença por todo o território brasileiro, entre o final da década de 80 até o ano de 1999, 19 estados brasileiros apresentaram casos da dengue, tornando-se um caráter epidêmico (WHO, 2016; PONGSUMPUN *et al.*, 2008).

Segundo Amorin *et al.* (2009), ocorreram grandes epidemias da doença entre os anos 2000 e 2007 no Rio de Janeiro. A região do Nordeste apresentou picos acentuados da doença nos anos de 2008 até 2009, com mais de 11 mil casos da doença por todo o estado da Bahia, com destaque para as cidades de Itabuna, Jequié e Ilhéus (BRASIL, 2012).

Segundo o boletim epidemiológico da secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (2017), no Nordeste, no ano de 2016, foram registrados 1.483.623 casos prováveis de dengue. Ainda em 2017, a região Nordeste apresentou o maior número de casos prováveis (80.447 casos; 37,4%) em relação ao total do país. Para os casos graves e óbitos de dengue neste ano, foram 169 casos de dengue grave e 1.821 casos de dengue com sinais de alarme.

No estado do Ceará, são notificados casos da dengue desde a década de 80, assim como, foram registrados o aparecimento dos quatro sorotipos (DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4). Desde o aparecimento na década de 80 até o ano de 2015, foram registradas sete grandes epidemias nos anos de 1987, 1994, 2001, 2008, 2011, 2012 e 2015. A partir de 2015, foi confirmada também a transmissão dos vírus da chikungunya e da zika (SESA, 2016).

No ano de 2017, foram registrados 79.770 casos de dengue no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAM), no estado do Ceará, significando uma taxa da incidência acumulada na região de 889,9 casos por 100 mil habitantes, distribuídos nos 184 municípios. Neste cenário, foram notificados 30,7% dos casos em 88,5% dos municípios. Onde os casos confirmados, mostraram uma concentração de 63,4% dos casos nas idades entre 15 e 49 anos (SESA, 2017).

2.2 Vírus da Dengue e suas características

O vírus da Dengue trata-se de um arbovírus (vírus transmitidos por insetos e aracnídeos), da família *Flaviviridae*, o gênero dos flavivírus e apresenta quatro sorotipos virais: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4. Ambos os sorotipos podem ocasionar a forma clássica da doença e a mais grave como a Dengue Hemorrágica (MUSSO; GUBLER,

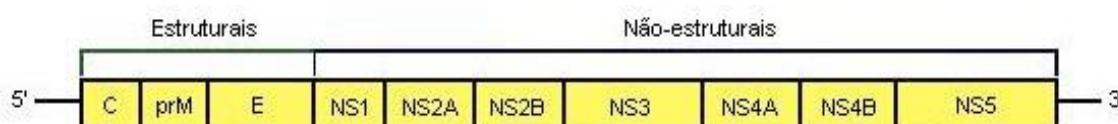
2016; WESTAWAY *et al.*, 1985). Os arbovirus podem causar doenças em humanos, tais como as arboviroses do tipo Dengue, Zika, Chikungunya e Febre Amarela. Estes tipos virais podem ser transmitidos por mosquitos (CIOTA; KRAMER, 2010).

Segundo Baltimore (1971), os vírus têm como classificação a associação em famílias segundo a natureza e estratégia de replicação do genoma viral. No que diz respeito a este sistema de classificação, aqueles vírus que possuem genomas com uma única fita de RNA, são classificados segundo a sua polaridade, em positivos (RNA+) e negativos (RNA-). A classe da família flaviviridae, pertence ao grupo IV da classificação de Baltimore, onde a forma em que ocorre a tradução das proteínas virais, ocorre no sentido positivo da fita de RNA ao acessar a célula hospedeira, a fim de ocasionar a replicação viral.

Cada partícula do vírus consiste de um genoma com uma fita simples de RNA com polaridade positiva com aproximadamente 11 mil pares de base, o qual possui uma única fase de leitura, que codifica uma poliproteína que possui cerca de 3.400 aminoácidos, onde será posteriormente dividida em três proteínas estruturais (E, M e C) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5), através da divisão ocasionada por proteases celulares e virais, que realizam a hidrólise das ligações peptídicas de proteínas, dividindo em aminoácidos menores. (LINDENBACH, *et al.*, 2007; MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005; RICE *et al.*, 1985, HAHN *et al.*, 1988).

As proteínas estruturais que são responsáveis por proteger o RNA viral são a proteína do capsídeo (C), a membrana (M), e a proteína do envelope (E). Enquanto as proteínas não estruturais são responsáveis pela replicação do vírus (Figura 1). Sobre o vírus, sabe-se que este possui partículas esféricas com diâmetro de 50 nm, sendo estas envelopadas, contendo o RNA do vírus encapsulado pela proteína do capsídeo, onde o envelope é permeado através de uma bicamada fosfolipídica que é derivada das células do hospedeiro e ancoradas através da proteína E na forma de dímero. Na membrana, essas proteínas se encontram com geometria icosaédrica (RICE *et al.*, 1985; MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005).

Figura 1 - Organização genômica do vírus da dengue



Fonte: Whitehead et al. (2007).

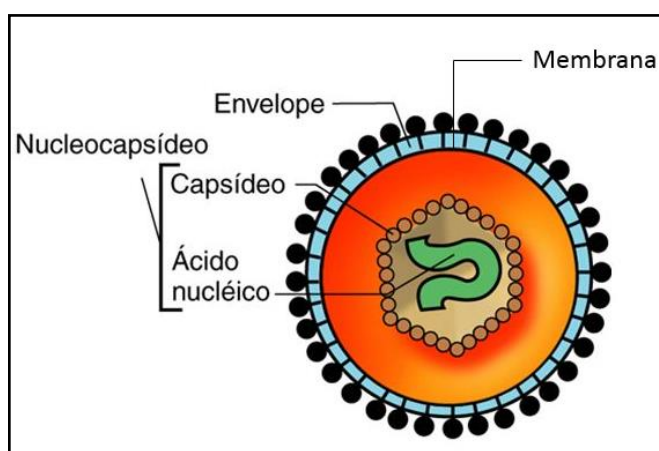
O genoma viral possui duas regiões não codificadoras (RNC5' e RNC3') nas extremidades 5' e 3'. Estas regiões possuem cerca de 100 e 450 nucleotídeos,

respectivamente. O genoma viral possui uma extremidade 5' de região UTR (*untranslated region*), uma região *Open Reading frame* (ORF) e uma extremidade 3', também de região UTR. Estas regiões das extremidades apresentam sequências conservadas e estruturas secundárias de RNA que realizam os processos de replicação, tradução e empacotamento viral (LINDENBACH, *et al.*, 2007; CHAMBERS; *et al.*, 1990)

2.2.1 Proteínas Estruturais

De acordo com Lindenbach, *et al.* (2007), na estrutura do vírus as três proteínas estruturais são transcritas inicialmente e são consideradas glicoproteínas (Figura 2). O nucleocapsídeo é formado pela junção da proteína do capsídeo (C) e o RNA viral. A proteína do capsídeo possui de 11 a 12 kDa e sua estrutura tem caráter básico. A ligação que ocorre entre o RNA viral o capsídeo deve-se a presença das extremidades N- e C- terminais (terminais amina e carboxi) da molécula do capsídeo. Estas extremidades resultam no caráter básico desta proteína estrutural (CHAMBERS; *et al.*, 1990; LINDENBACH, *et al.*, 2007). O capsídeo atua como uma capa proteica, cuja função principal é proteger o genoma do vírus.

Figura 2 - Morfologia do Vírus - Vírus Envolopado



Fonte: adaptado de Zanin (2011)

Entre as proteínas estruturais, a proteína do capsídeo (C) possui massa molecular de 12 kDa e é considerada uma proteína básica que juntamente com o RNA viral produz o nucleocapsídeo (CHAMBERS; HAHN; *et al.*, 1990). Em sua estrutura, existe uma região central hidrofóbica, responsável pela associação da proteína da membrana com a proteína do envelope (LINDENBACH, *et al.*, 2007).

No vírus, inicialmente a estrutura C-terminal do capsídeo atua como precursora da proteína da membrana (M), no retículo endoplasmático (RE), devido a presença de uma âncora hidrofóbica, que faz a clivagem da forma imatura da proteína da membrana prM na sua forma madura M, que torna-se responsável por replicar o vírus na célula. A glicoproteína

prM na sua forma imatura possui cerca de 26 kDa, enquanto a sua forma madura após a clivagem da prM apresenta 8 kDa. (LINDENBACH, *et al.*, 2007; ASSENBERG *et al.*, 2009; PAROUTIS; TOURET; GRINSTEIN, 2004; ZHANG *et al.*, 2003; ZHANG *et al.*, 2007).

A glicoproteína E, possui massa molecular entre 50 e 55 kDa e se encontra na forma de dímeros. Esta glicoproteína é o componente básico presente na superfície do vírus e está diretamente relacionado com as propriedades antigênica e fenotípica do vírus, bem como responsável pela introdução do vírus na célula do hospedeiro. Ela possui uma estrutura N-glicosilada responsável pela ligação e fusão com a membrana celular do hospedeiro (MODIS *et al.*, 2004).

Outro ponto relevante desta glicoproteína, deve-se a presença de três domínios funcionais em sua estrutura (I, II, III). A entrada e introdução do vírus na célula ocorrem nos domínios I e II, respectivamente. Enquanto que o terceiro domínio (III), está relacionado com a entrada do agente infeccioso no citoplasma (tropismo), multiplicação do vírus e escape dos anticorpos neutralizantes (ZHANG *et al.*, 2003).

2.2.2 Proteínas não estruturais

Existem cerca de sete proteínas não estruturais. Essas glicoproteínas são importantes para a replicação do vírus na célula. A primeira proteína não estrutural, é a glicoproteína NS1, cuja massa molecular varia entre 45-48 kDa e pode ser encontrada em duas formas (monômero e dímero). Sua forma de expressão pode ocorrer na superfície da célula, na região perinuclear (entre duas membranas lipoproteicas) e na forma solúvel, onde passa a ser secretada pelas células infecciosas. Ao ser secretada na forma solúvel para o sangue, pode ser utilizada como marcador de virulência do DENV no soro de pacientes infectados, bem como a possibilidade de produção de anticorpos apartir desta glicoproteína (STOHLMAN *et al.*, 1975; WESTAWAY; GOODMAN, 1987; ALCON *et al.*, 2002; LIBRATY *et al.*, 2002).

As glicoproteínas NS2A e NS2B são proteínas menores, de 22 kDa e 14 kDa, multifuncionais, com domínios hidrofóbicos, relacionadas com a replicação viral. A NS2A possui ligação com membranas celulares, bem como possui elevada afinidade com o RNA do vírus, através da sua ligação com a região RNC3 do genoma viral. Esta glicoproteína, possui importância no transporte do RNA viral para a região do empacotamento e construção de partículas virais. A NS2B, possui importância na funcionalidade da protease de NS3, atuando como um co-fator responsável por sua atividade. (CHAMBERS; MCCOURT; RICE, 1989; LEUNG, *et al.*, 2008; MACKENZIE, JONES e YOUNG, 1998; LUO *et al.*, 2008).

Segundo Luo *et al.* (2008), a glicoproteína NS3, de 70 kDa, possui cerca de 618 aminoácidos, e é uma proteína citoplasmática multifuncional. Ela é a segunda maior proteína do genoma viral, cuja atividade enzimática está diretamente relacionada com o processamento da poliproteína, bem como na replicação do RNA do vírus. Esta glicoproteína possui dois domínios funcionais, tais como: a protease e a helicase, estando presentes nas extremidades N- e C-terminal, respectivamente.

O domínio da protease é N-terminal em NS3 (resíduos 1-180) e cliva a poliproteína viral em vários sítios que atuam nas junções entre as proteínas NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A e NS4B/NS5, assim como atua na formação da extremidade C-terminal da proteína do capsídeo madura (LINDENBACH, *et al.*, 2007)

A função protease da NS3 está diretamente relacionado com o co-fator NS2B. Onde a ausência desse co-fator, torna inativa a função protease da NS3. A função helicase está diretamente relacionada com a replicação viral, o que torna o estudo de NS3, responsável por produzir drogas antivirais (XU *et al.*, 2006; LINDENBACH, *et al.*, 2007; KAPOOR *et al.* 1995).

As glicoproteínas NS4A e NS4B, possuem caráter hidrofóbico elevado e estão ligadas a membrana. Elas são consideradas proteínas virais pequenas, de 16 kDa e 27 kDa, respectivamente, que interagem com o complexo de replicação, para ocasionar a replicação do RNA viral (MILLER; SPARACIO; BARTENSCHLAGER, 2006).

Entre as proteínas não estruturais do genoma viral, a NS5 é a maior delas, com peso molecular de 103 kDa. Trata-se de uma proteína viral, multifuncional, que possui uma sequência de aminoácidos conservados. Sua estrutura é básica, com partes hidrofóbicas, porém não são longas. Esta proteína possui atividade semelhante ao RNA Polimerases RNA Dependentes (RDRP), cuja função é responsável por auxiliar na síntese de moléculas de RNA, na qual usa como formato moléculas de DNA. Atua ainda como metiltransferase responsável pela composição da região não codificadora RNC 5' do terminal cap do RNA viral. (CHAMBERS; *et al.*, 1990; KROSCHEWSKI *et al.*, 2008; MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005; YAP *et al.*, 2007).

2.3 Importância da proteína não estrutural NS1

A proteína NS1 é uma glicoproteína expressa em células de mamíferos infectadas como monômeros solúveis que formam dímeros no lúmen do retículo endoplasmático, que são transportados posteriormente para a superfície celular, onde permanece como uma proteína associada à membrana ou liberada para meio extracelular na forma dimérica

(WINKLER *et al.*, 1988; YOUNG *et al.*, 2000). Embora a função da NS1 não seja totalmente elucidada, as evidências disponíveis sugerem que esta proteína esteja envolvida na replicação do RNA viral.

Outro fator de importância seria a sua participação na etapa prévia da replicação do RNA viral, montagem, maturação e, possivelmente, estaria envolvida na patogênese da doença (AVIRUTNAN *et al.*, 2006; MACKENZIE; JONES; YOUNG, 1996). Além disso, a alta imunogenicidade das proteínas NS1 da dengue e outros flavivírus aumentou o interesse tanto como antígeno quanto a métodos de diagnóstico (LINDENBACH, *et al.*, 2007; CHIANG *et al.* 2012; HANG *et al.*, 2009; SAMPATH e PADMANABHAN, 2008).

Um dos métodos de diagnóstico utilizado é através da detecção da NS1. Esta é comumente utilizada, pois esta proteína é muito conservada, sendo expressa na superfície das células infectadas e essencialmente por ser secretada para a circulação sanguínea, pelas células infecciosas, podendo ser detectada em amostras de soro de pacientes durante a fase aguda da infecção (ALCON *et al.*, 2002; YOUNG *et al.*, 2000).

Segundo Libraty *et al.* (2002), os níveis de NS1 estão associados com os níveis de viremia no plasma. Desta forma, são encontrados níveis elevados de NS1 em pacientes com a forma mais grave da doença. Com isso, a detecção de antígenos pode ser utilizada como uma ferramenta no diagnóstico na predição de gravidade e em estudos soropidemiológicos da doença (ANANDARAO *et al.*, 2006; XU *et al.*, 2006).

A NS1 do vírus da dengue pode ser expressa de forma recombinante em sistemas procarióticos. A expressão de antígenos recombinantes deve-se a questão da utilização desses antígenos com características semelhantes a forma nativa do vírus para produção de kit de diagnósticos e vacinas. O sistema de expressão utilizando sistema procariótico é bastante utilizado para produção de proteínas heterólogas, apresentando certas vantagens como, como a facilidade de manipulação, o requerimento de uma fonte de baixo custo de carbono e uma rápida acumulação de biomassa por cultura (SAHDEV *et al.*, 2008).

Além disso, esse sistema possui elevada quantidade de cepas comercializadas, apresentando diferentes vantagens e aplicabilidades relacionados ao processo de produção de proteínas recombinantes. Neste cenário, a bactéria *Escherichia coli* é amplamente utilizada, por ser considerada uma cepa patogênica, onde cresce fortemente em meio mínimo e deficiente em proteases capazes de interferir no isolamento de proteínas recombinantes intactas. (CHART *et al.*, 2000).

Neste tipo de cepa são utilizados diferentes padrões de fusão para auxiliar na purificação dessas proteínas expressas, sendo utilizado comumente a adição de caudas de

histidina (His-tag) para purificar por cromatografia de afinidade com metais (TERPE, 2003; GAGNON, *et al.*, 2012; YOHAN, *et al.*, 2016 e AMORIN, *et al.*, 2010).

Entretanto, estes sistemas de expressão, na maioria das vezes não são capazes de produzir proteínas recombinantes idênticas à selvagem devido à sua simplicidade. As bactérias não possuem mecanismos sofisticados para realizarem modificações pós-traducionais os quais estão presentes em organismos superiores. Além de que a proteína recombinante produzida em sistemas de expressão bacteriana geralmente não é solúvel e perde características estruturais e imunológicas da proteína viral nativa. Outro ponto a destacar, neste cenário, deve-se ao arranjo conformacional do epítipo do vírus sintetizado não ser semelhante ao epítipo do vírus nativo, afetando desta forma a produção de anticorpos que são gerados pela resposta imune, posterior a imunização do vírus no organismo. (ELENA *et al.*, 2005; KAMIONKA, 2011).

Diante disto, se faz necessário encontrar meios de purificação para proteína NS1 nativa do vírus, para que possa ser utilizada na produção de anticorpos que reajam de forma específica com o vírus.

2.4 Técnicas cromatográficas para a separação e/ou purificação de Proteínas

Processos cromatográficos permitem explorar características físico-químicas das moléculas biológicas, como afinidade biológica, carga elétrica, tamanho molecular e hidrofobicidade. Existem comercialmente uma variedade de resinas cromatográficas com aplicação na purificação de proteínas, sendo as técnicas como a Cromatografia de troca iônica (CTI), Cromatografia de afinidade com ligantes bio ou pseudobioespecíficos, com maior destaque, devido à alta afinidade em relação fragmentos de anticorpos de diferentes proteínas, bem como a possibilidade de redução no consumo de energia, volume de efluentes e consumo de químicos. Todavia, existem outras técnicas que também são utilizadas para purificação de proteínas, tais como: Cromatografia de interação Hidrofóbica, Cromatografia de Modo Misto e Separação por Exclusão de Tamanho (YAVUZ, *et al.*, 2006, BAYRAMOĞLU *et al.*, 2007; WONGCHUPHAN *et al.*, 2009, SILVA, 2004, GONDIM, *et al.*, 2014).

2.4.1 Cromatografia por afinidade

Um método de adsorção que trabalha com reconhecimento por meio de um ligante imobilizado e com separação da molécula-alvo é a técnica de cromatografia por afinidade. Este tipo de técnica cromatográfica leva em consideração inicial a separação através da adsorção da molécula alvo por meio do ligante, à medida que o passo posterior

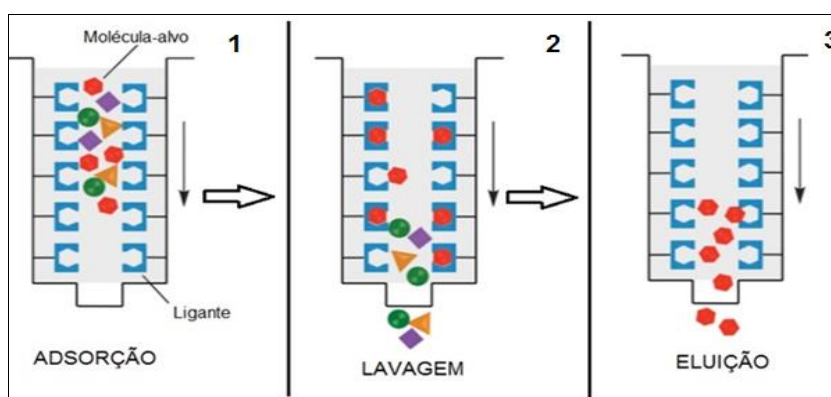
corresponde a etapas de dessorção (eluição). Segundo Hage (1999), esta técnica trabalha com interações biológicas, tais como: anticorpo com antígeno, enzima com inibidor, sendo usada desde os anos 60, para separação e purificação de proteínas e enzimas. Neste caso, proteínas, enzimas e anticorpos podem ser utilizados como ligantes para obtenção de novos adsorventes (HAGE, 1999; WU, *et al.*, 2006).

É considerada uma técnica de separação bioquímica que proporciona uma interação reversível entre o ligante e a proteína de interesse. Essa alta especificidade de ligação proporcionada pelo ligante é explorada para adsorção seletiva de proteínas alvo em uma mistura complexa de proteínas a qual pode ser eluída utilizando competidores análogos, agentes desnaturantes ou simplesmente ajustando alguns fatores, como pH, força iônica ou polaridade (DENIZLI E PIŞKIN, 2001; WU *et al.*, 2006; AYYAR *et al.*, 2012).

Esse método trabalha também, com a utilização de ligantes bioespecíficos, para purificação de anticorpos, devido sua especificidade com essas moléculas, porém em etapas de eluição e regeneração da coluna, podem ocasionar desnaturação desses ligantes. Estudos também levam em consideração outras desvantagens, quanto a baixa estabilidade e alto custo destes ligantes (CUTLER, 1996; YAVUZ *et al.*, 2006)

O meio de operação desta técnica consiste no reconhecimento molecular (Figura 3), cuja molécula com característica específica de reconhecimento (ligante de afinidade) é imobilizada em uma matriz como suporte insolúvel. Esta matriz pode apresentar característica polimérica na forma de membrana, monolitos ou esferas. Em seguida, o ligante imobilizado na matriz passa a capturar de forma seletiva a molécula-alvo (analito), quando em condições favoráveis de operação no leito fixo, ocorre a passagem da solução contendo a molécula-alvo pelo leito (Etapa 1). Posteriormente, é realizada a fase de lavagem (Etapa 2) com uma solução própria para remoção de impurezas não adsorvidas no processo (SMITH, 2015).

Figura 3 - Etapas de Adsorção, Lavagem e Eluição na Cromatografia de Afinidade



Fonte: Adaptado de Smith (2015)

A última etapa consiste na eluição (dessorção) da molécula-alvo através da passagem de um eluente, que acarretará na quebra da interação do ligante com a molécula-alvo e posterior recuperação da mesma. Para o eluente, nesta etapa são realizados ajustes de pH e força iônica, para torna-lo um solvente específico, que favorecerá a separação ligante-alvo. No caso em que ocorre uma interação com ligante livre competitivo atuando como um eluente de competição é selecionado uma molécula semelhante ao ligante porém com maior atração pela molécula-alvo, assim o competidor devido sua maior especificidade rouba do ligante a molécula de interesse. (SMITH, 2015; GE HEALTHCARE, 2007).

Neste contexto, os ligantes de afinidade, devem apresentar uma afinidade específica com a proteína-alvo, deve-se avaliar uma viabilidade dessa imobilização, de modo que haja uma ligação estável em condições drásticas, como as utilizadas nas etapas de lavagem e eluição (DENIZLI e PIŞKIN, 2001).

A cromatografia de afinidade possibilita alta seletividade, e usualmente, alta capacidade para com a proteína alvo (GE HEALTHCARE, 2007). Alguns fatores são extremamente importantes para obtenção de elevados níveis de produtividade e pureza, as quais podem citar: o tipo de ligante empregado e a matriz utilizada (AYYAR *et al.*, 2012).

2.4.1.1 Matriz cromatográfica

Neste tipo de método cromatográfico uma adequada matriz é essencial, pois esta atuará como suporte para o ligante de afinidade. Logo, as características a seguir são indicadas para identificar uma excelente matriz: ser uniforme, macroporosa, hidrofílica, mecânica e quimicamente estável, seletiva, insolúvel no solvente utilizado na purificação e fornecer grande área superficial para o ligante (HAGE, 1999).

As matrizes cromatográficas normalmente em cromatografia de afinidade podem ser divididas como: naturais, sintéticas e inorgânicas. Como matrizes naturais existem as esferas de agarose, dextrose e celulose, que proporcionam a maioria das características mencionadas anteriormente para uma excelente matriz cromatográfica. No caso de matrizes sintéticas, a literatura relacionada o uso de poliestireno (STAAK *et al.*, 1996) e derivados de polimetacrilatos (ROBERTS *et al.*, 2009), à medida que as sílicas porosas (XI E WU, 2004) podem ser exemplos de matrizes inorgânicas.

Segundo Urh, Simpson e Zao (2009), a matriz deve ser macroporosa com tamanho uniforme de partículas e poros e com boas propriedades de fluxo. O tamanho do poro de uma matriz está inversamente correlacionado com a sua área superficial, o que, por sua vez, afeta

diretamente a quantidade de ligante imobilizado, no caso afeta sua capacidade. O tamanho dos poros correlaciona-se ao limite de exclusão, que é o tamanho (peso molecular) ou o tamanho de proteínas que não podem entrar no poro. Os poros grandes não sofrem de efeito de exclusão de tamanho e permitem o acesso sem impedimento de moléculas grandes aos ligantes imobilizados, mas têm área superficial reduzida e menor densidade de ligante que pode resultar em uma menor capacidade.

Um fator importante que determina a utilidade da resina de afinidade é a capacidade de produzir de forma reprodutiva as características de desempenho semelhantes. Assim, é importante determinar condições de reação ótimas, incluindo a quantidade do ligante necessário para a síntese a fim de assegurar um desempenho constante. Determinar a quantidade ideal de ligante na síntese também pode reduzir o custo, ao se utilizar menor quantidade de ligante. Para a ligação covalente, muitas vezes é desejável determinar o quanto de ligante está sendo imobilizado na matriz e determinar como as condições de acoplamento afetam a quantidade de ligante imobilizado. Na cromatografia de afinidade, podem ser utilizados ligantes bio e pseudobioespecíficos (DENIZLI e PIŞKIN, 2001).

2.4.1.2 Ligantes pseudobioespecíficos

No caso dos ligantes pseudobioespecíficos (corantes, aminoácidos e íons metálicos quelatados), são utilizados em cromatografia de afinidade com proteínas, e apresentam diferenças em relação aos ligantes bioespecíficos, por exemplo, na etapa de eluição onde ocorrem em condições menos drásticas, devido a menor interação ligante-proteína alvo. Outro ponto de destaque da aplicação destes ligantes na purificação de proteínas, deve-se ao ponto de vista econômico, pois possuem menores custos quando comparado aos ligantes bioespecíficos (HERMANS, *et al.*, 2014).

Ligantes pseudobioespecíficos como os corantes são considerados como uma das alternativas importantes para cromatografia de afinidade específica. Os corantes são capazes de interagir com a maioria dos tipos de proteínas, em alguns casos de uma maneira bem específica. Eles são considerados baratos comercialmente e podem ser facilmente imobilizados, especialmente em matrizes com grupos hidroxilas. Embora os corantes sejam de natureza sintética, eles ainda são classificados como ligantes de afinidade porque interagem com o sítio ativo de muitas proteínas imitando a estrutura dos substratos, cofatores ou agentes de ligação para essas proteínas (DENIZLI e PIŞKIN, 2001).

Uma série de corantes têxteis, conhecidos como corantes reativos, foram utilizados para purificação de proteínas. A interação entre o corante e as proteínas pode ser por

combinação eletrostática, hidrofóbica e ligação e hidrogênio. A seleção da matriz de suporte é a primeira importante consideração em sistemas de afinidade com corantes. Existem vários métodos para imobilização de moléculas de corante na matriz de suporte, em que geralmente são seguidas várias etapas intermediárias. As etapas de adsorção e eluição devem ser cuidadosamente planejadas para uma separação bem-sucedida. Sistemas de afinidade com corantes na forma de sorventes esféricos ou como membranas de afinidade têm sido utilizados na separação de proteínas (SMITH 2015; HERMANS, *et al.*, 2014; DENIZLI e PIŞKIN, 2001).

2.4.2 Cromatografia de troca iônica (CTI)

Na adsorção, ocorre certas diferenças de interações entre a fase móvel e a fase estacionária, devido a migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre neste tipo de processo de separação. A aplicação de uma estrutura iônica, como fase sólida, envolve tanto processo de adsorção do tipo físico, quanto processo de troca iônica propriamente dito. Para este tipo de adsorção sólido-líquido, as moléculas existentes na fase líquida, migram para uma zona interfacial, através da presença de forças atrativas não compensadas na superfície da fase sólida. As forças existentes no processo de adsorção, são do tipo Van der Waals e interações eletrostáticas, sendo que as forças de Van der Waals, estão envolvidas no processo de adsorção, tanto física, quanto de troca iônica, porém as forças eletrostáticas são significantes apenas no caso de adsorventes, como as resinas de troca iônica, que possuem uma estrutura iônica (ARCANJO, 2014; RUTHVEN, 1985).

Atualmente, diversos trabalhos vêm sendo publicados apresentando as vantagens do processo de cromatografia por troca iônica, através de vários tipos de materiais trocadores de íons. Das vantagens que a cromatografia apresenta sob outros processos, pode-se destacar a redução no consumo de energia, volume de efluentes e consumo de químicos (BLANC *et al.*, 2015).

Em processos adsortivos, quanto a aplicação de métodos de purificação, a cromatografia de troca iônica, apresenta algumas vantagens em relação aos outros métodos existentes, devido sua facilidade de operação, efetividade quanto ao escalonamento nos processos de isolamento de proteínas e por apresentar vários estudos sobre sua elevada capacidade de recuperação e purificação de bioprodutos (SILVA, 2010; ZUÑIGA *et al.*, 2003).

Este método cromatográfico é utilizado em etapas iniciais de purificação, através da separação grupos de compostos, por meio de suas cargas elétricas. Ocorre neste processo, a separação de proteínas, baseado na carga da proteína de interesse, onde proteínas com cargas

positivas devem passar através de uma coluna com carga oposta, ou seja, carga negativa, de modo que, a passagem de proteínas com carga positiva seja impedida. No processo de purificação utilizando CTI, ocorre a adsorção através da matriz da proteína de interesse, com posterior eluição (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2007).

A atividade bioquímica do processo de cromatografia de troca iônica consiste na competição através dos íons de interesse e contaminantes com os grupos carregados da fase estacionária. As cargas das moléculas de proteínas, podem ser positivas e negativas, devido a a superfície de seus grupamentos. O caráter positivo das proteínas é constituído pelos grupos de aminoácidos, tais como: histidina, lisina, arginina e das aminas terminais. Enquanto o caráter negativo, deve-se pela presença dos grupos carboxílicos terminais, bem como, da presença de ácido glutâmico e aspártico (LIMA, 2014; PESSOA; KLIKIAN, 2005).

A CTI, pode ser utilizado, em qualquer parte de um procedimento de purificação em várias etapas, sendo inicialmente, uma capacidade de ligação elevada e vazões elevadas, permitem a captura tanto da proteína alvo, como das impurezas em massa a partir de uma amostra de grande volume. O passo final da purificação de alta resolução consiste em remover as impurezas restantes (MILLER, 2013).

Em particular, a técnica de cromatografia iônica, geralmente, é utilizada para ligar a molécula alvo, mas também pode ser utilizada para ligar impurezas, deixando a proteína alvo passar pela coluna. Esta técnica pode ser repetida a diferentes valores de pH para separar várias proteínas que têm propriedades de carga distintamente diferentes. Alternativamente, um passo de purificação utilizando a troca catiônica pode ser seguido por uma segunda etapa de purificação utilizando a troca aniônica, ao mesmo pH (GE HEALTHCARE, 2010).

2.4.2.1 Mecanismo de separação por troca iônica

A teoria existente na separação de moléculas por troca iônica obedece a lei da eletroneutralidade, onde a quantidade de íons removidos é substituída por uma quantidade semelhante de outra espécie iônica de mesmo sinal. Neste processo, leva-se em consideração as diferenças entre as posições e a origem dos sítios de troca. Os sítios de troca são constituídos de grupos iônicos, capazes de criar uma ponte eletrostática com um íon de carga oposta, na qual permite a troca de íons (BODAMER; KUNIN, 1953).

De maneira geral, a teoria de troca iônica abrange o fenômeno que ocorre em uma estrutura insolúvel, fortemente interligada, onde íons de cargas negativas ou positivas não móveis (co-íons), se ligam aos contra-íons, que possuem cargas opostas. Neste método, os

contra-íons movem-se livremente, sendo que outros íons de mesmo sinal, podem ser substituídos pelos contra-íons originalmente ligados à estrutura da resina (CREN, 2009).

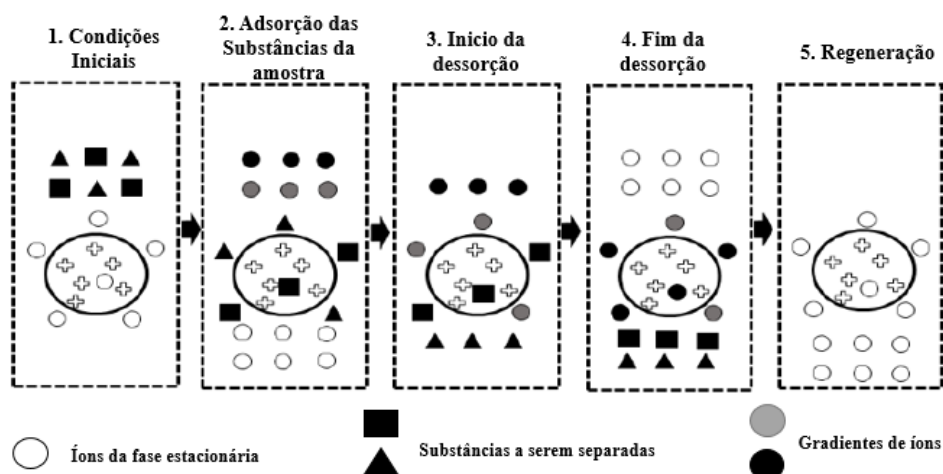
A técnica de cromatografia de troca iônica separa as proteínas com diferenças em sua carga superficial, de modo que, há uma separação de alta resolução com elevada capacidade de carga da amostra. A separação baseia-se na interação reversível entre uma proteína carregada com a carga oposta da estrutura insolúvel. As proteínas alvo são concentradas durante a adsorção e são obtidas ao final de forma concentrada e purificada. Esta técnica utiliza vazões elevadas, pois a cinética de adsorção para a cromatografia de troca iônica é considerada rápida (GE HEALTHCARE, 2010).

O mecanismo de separação de troca iônica (Figura 4) consiste de um primeiro estágio, onde há um equilíbrio entre os trocadores iônicos, em condições iniciais, visto que, nesta etapa são utilizados cátions e ânions simples (sódio e cloro), como contra íons (íons presentes na matriz). Na segunda etapa, ocorre a aplicação e adsorção das substâncias presentes na amostra, de modo que, os íons são liberados na fase estacionária em quantidade equivalente à adsorvida. Nesta etapa há a formação da ponte eletrostática, através da interação de um grupo iônico com um íon de carga oposta (BODAMER; KUNIN, 1953; YAGINUMA, 2007).

Na terceira etapa, inicia-se o processo de dessorção, através da passagem de um eluente apropriado, em condições favoráveis quanto ao ajuste de pH e força iônica, para remoção das substâncias retidas na coluna. Etapas finais (4 e 5), consistem na retirada de substâncias que não foram eluídas previamente através de condições iniciais de operação, bem como, permite a regeneração da coluna, por meio de um reequilíbrio dos trocadores iônicos. Portanto, a separação das substâncias ocorre devido à diferença de graus de interação delas com o trocador iônico, sendo estas interações controladas pelo pH, força iônica, eluente, entre outros fatores (BODAMER; KUNIN, 1953; YAGINUMA, 2007).

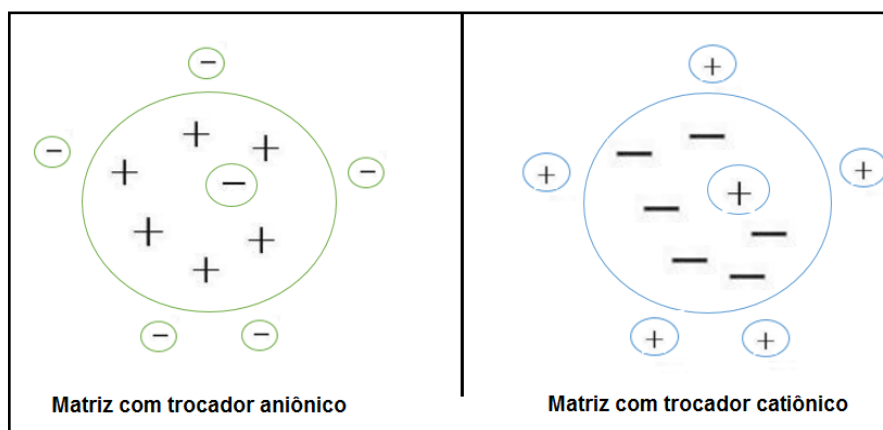
A matriz com trocador aniônico permite a troca de ânions, de modo que, a mesma contém grupos iônicos positivos acoplados a matriz. A matriz de trocador catiônica, opera de maneira inversa, onde permite a troca de cátions em uma matriz composta por ligação de grupos iônicos negativos conforme visualizado na Figura 5 (HIESTER; VERMEULEN, 1952; YAGINUMA, 2007).

Figura 4 - Mecanismo de separação por troca iônica



Fonte: Adaptado de YAGINUMA, (2007).

Figura 5 - Matriz com trocadores aniônicos e catiônicos



Fonte: O Autor adaptado de Yaginuma (2007).

Neste cenário, parâmetros como eficiência, seletividade, resolução e fator de capacidade afetam significativamente a resposta deste processo. Outros fatores que influenciam na separação de proteínas pela troca iônica, são as mudanças de pH e força iônica decorridos da concentração de sal na interação superfície-proteína (GE HEALTHCARE, 2010; TSUMOTO *et al.*, 2007).

A carga superficial líquida das proteínas varia de acordo com o pH. Geralmente, quando acima do seu ponto isoelétrico (pI), uma proteína irá se ligar a um trocador aniônico carregado positivamente. Quando abaixo do seu pI, uma proteína irá se ligar a um trocador catiônico carregado negativamente. Contudo, mesmo se a proteína tiver uma carga negativa líquida, esta também, poderá se ligar a um trocador catiônico carregado negativamente, pois pode haver grupos carregados positivamente na superfície da proteína, que podem ser

suficientes para que ocorra a ligação. Isto também pode ser verdadeiro para o caso oposto, com uma proteína de carga positiva líquida se ligará a um trocador aniônico positivamente carregado (HELFFERICH, 1965).

Outro fator importante na cromatografia trata-se da força iônica (concentração) da fase móvel. As proteínas se ligam à medida que são carregadas numa coluna com baixa força iônica. As condições são então alteradas para que as substâncias ligadas sejam eluídas (sofram dessorção) diferencialmente. A eluição, é normalmente realizada, aumentando a concentração de sal ou alterando o pH em um gradiente. O sal comumente utilizado é NaCl, mas podem também ser utilizados outros sais para influenciar na separação, por exemplo, K^+ , Ca^{+2} , Mg^{+2} e I^- . Neste contexto, o tampão utilizado, pode também, afetar a separação, os íons que se ligam à proteína podem alterar seu comportamento na cromatografia de troca iônica (GE HEALTHCARE, 2010).

Um meio de troca iônica forte tem a mesma densidade de carga na sua superfície em uma ampla faixa de pH, enquanto que a densidade de carga de um trocador iônico fraco, muda com o pH. A seletividade e a capacidade de um trocador iônico fraco, varia de acordo com valores de pH diferentes (ANAND; KANDARAPU; GARG, 2001).

Neste cenário, um design mais econômico desses processos pode ser alcançado através de uma melhor compreensão de seus fundamentos. Por exemplo, a seletividade entre o produto desejado e as suas impurezas mais próximas pode ser melhorada, com uma concepção favorável de parâmetros, responsável por modificar os gradientes (por exemplo, sal ou pH). Nesta abordagem, é necessário um projeto de processo racional, baseado na simulação da eluição para diferentes gradientes. A otimização deste processo, é baseado através de um modelo, que ajuda a reduzir o tempo de desenvolvimento do processo e permite a consideração de uma variedade mais ampla de condições operacionais (GUÉLAT *et al.*, 2010).

2.4.2.2 Classificação das resinas de troca iônica

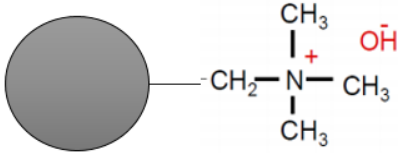

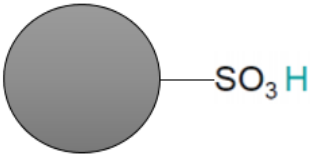
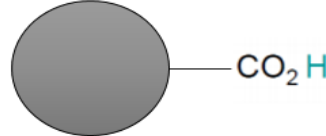
Segundo Guo, Chang e Hussain (2009), resina de troca iônica é constituída de duas partes: a primeira composta por uma matriz de característica polimérica e a segunda parte composta por grupos de íons ativos, com cargas positivas e negativas. A matriz polimérica se trata, geralmente do estireno reticulado com divinilbenzeno (DVB).

Estas resinas apresentam duas diferenças, quanto a constituição do grupo matricial, onde podem ser microporosas, ou do tipo gel polimérico e macroporosas, como polímero macrorreticular produzida através de monômeros na presença de solventes

(ALEXANDRATOS, 2009; GUO; CHANG; HUSSAIN, 2009).

A classificação dos diferentes tipos de resina de troca iônica é estabelecida conforme o tipo de material que é obtida a matriz da resina, a estrutura do polímero e ainda de acordo com o grupo funcional fixado à matriz (Tabela 1), visto que a denominação de forte e fraca determinada para a classificação das resinas, deve-se a força que o grupo iônico fixado na matriz tem, em relação a sua completa ou não dissociação (BODAMER; KUNIN, 1953; HIESTER; VERMEULEN, 1952).

Tabela 1 - Classificação das resinas de acordo com os grupos funcionais fixados à matriz

Classificação - Resinas	Grupo Funcional	Estrutura Química
Aniônicas Fortes	Amônio-quartenário	
Aniônicas Fracas	Amino-grupos	
Catiônicas Fortes	Ácido Sulfônico	
Catiônicas Fracas	Carboxílicos ou fosfórico	

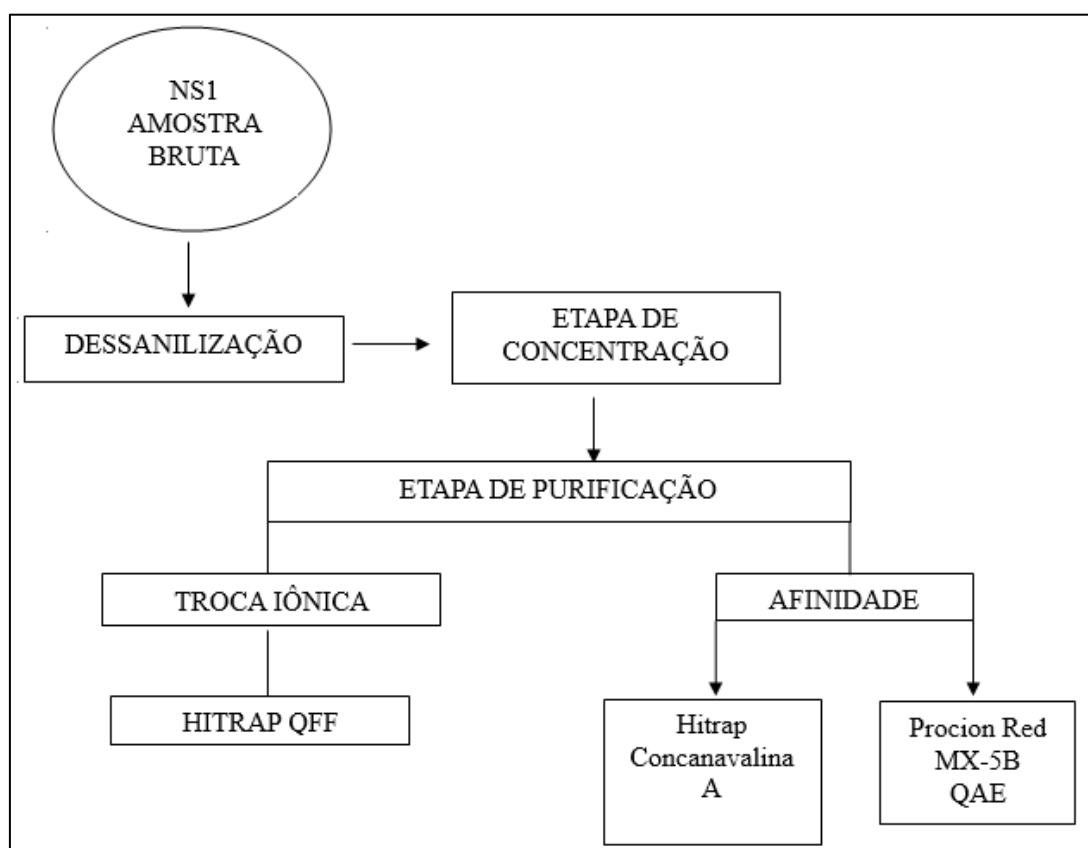
Fonte: adaptado de Arcanjo (2014).

Portanto, é necessário um modelo que leve em conta o efeito de diferentes parâmetros, responsáveis pela modificação na adsorção de proteínas. Estes parâmetros utilizados na cromatografia de troca iônica são compostos que modulam as interações eletrostáticas entre as proteínas e o material de troca de iônica. Neste caso, um sal (por exemplo, cloreto de sódio) é usado como modificador de gradientes de eluição. Tal modificação, também pode ser causado por influência do pH, porém há uma necessidade de conhecer o modelo isotérmico de adsorção, no qual tanto a concentração de sal quanto o pH são significantes no processo de troca iônica (GUÉLAT *et al.*, 2010).

3 METODOLOGIA

O fluxograma a seguir descreve as etapas realizadas para atingir os objetivos propostos, onde foi realizado inicialmente a caracterização inicial da amostra e etapas de concentração, seguidos por etapas cromatográficas de separação e purificação, para posterior etapas finais de caracterização da amostra obtida. Foram realizadas análises qualitativas para avaliar a obtenção da proteína não estrutural NS1 purificada.

Figura 6 - Fluxograma do processo de purificação da NS1-DENV2



Fonte: O Autor (2017)

3.1 Obtenção da proteína não estrutural NS1 do vírus da Dengue sorotipo II (DENV-2)

As amostras brutas de NS1 foram produzidas em colaboração com o Grupo de Pesquisa da Profa. Dra. Maria Izabel Florindo Guedes da Universidade Estadual do Ceará – UECE, no Laboratório de Cultivo Celular, onde as Células Vero foram cultivadas em garrafas de 75 cm² a 37° C em meio Leibovitz's (L-15 – Sigma) acrescido de 2% de soro fetal bovino (Vitrocell Embriolife) e 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina - Gibco) até atingirem confluência igual ou superior a 90%. Em seguida, as garrafas contendo as células foram lavadas com tampão fosfato-salino (PBS) (pH 7,4) e infectadas com o vírus

da Dengue 2 por duas horas a 37° C. Após esse período, foi acrescentado meio L-15 sem soro fetal bovino e incubadas a 37° C por aproximadamente 4 dias, até a visualização de sincício (designação dada a célula multinucleada, quando a membrana celular engloba vários núcleos). Decorrido esse período, o meio de cultura contendo o vírus e suas partículas virais, foram coletados.

3.2 Caracterização inicial da amostra bruta com a proteína NS1-DENV2

Foram realizadas caracterizações em 7 meios de cultura distintos, com volumes variando entre 10 e 20 mL, denominadas A1 a A7. As caracterizações envolveram dosagem de proteína total, eletroforese SDS-PAGE e dot blot.

3.2.1 Determinação de proteínas totais

As concentrações de proteínas totais das amostras coletadas do meio de cultura foram determinadas de acordo com a metodologia de Bradford (1976), sendo utilizado como controle a albumina de soro bovino (BSA) para a construção da curva analítica para este método.

Foi utilizada a proteína BSA para a obtenção da curva de calibração, com faixa de concentração de 0 a 2 mg/mL. Após o preparo do reagente de Bradford e da curva de calibração, iniciou-se a quantificação das amostras coletadas nos ensaios. Logo, para cada 0,20 µL de amostra deixou-se em contato com 1,0 mL do reagente de Bradford por 10 min em cubetas de poliestireno na ausência de luz. Após esse período, foram realizadas duplicata da amostra no espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm. Em seguida, foram obtidos os valores de concentração de proteínas totais para a curva de calibração.

3.2.2 Eletroforese (SDS-PAGE)

A técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes e não redutoras (SDS-PAGE) foi utilizada para caracterização inicial das amostras brutas com NS1-DENV2 a fim de identificar a presença de NS1 e demais proteínas presentes na amostra. As análises foram realizadas no equipamento Mini Protean III (BioRad, EUA) utilizando o gel de poliacrilamida (30% de acrilamida e 2,7% de bisacrilamida), conforme protocolo apresentado por Laemmli (1970), na concentração de 10%. As frações cromatográficas de cada etapa foram aquecidas a 95 °C por 4 min e alíquotas de 10 à 20 µL de cada amostra foram aplicadas aos géis. Foi utilizado padrão de baixo peso molecular (LMW) da GE (EUA), contendo as seguintes proteínas: Fosforilase - 97 kDa, Albumina - 66 kDa, Ovalbumina Carbonica - 45 kDa, Anidrase - 30 kDa, Inibidor de tripsina - 20,1 kDa e α -lactalbumina - 14,4 kDa e

tampão de amostra com β -mercaptoetanol. Os géis foram submetidos a uma voltagem de 150 V, em cubas verticais e a coloração foi realizada com o corante comassie brilhante blue.

Em cada gel de poliacrilamida, realizado nos ensaios cromatográficos, foi adicionado poço com amostra inicial (I) e um poço com albumina (A). Foram analisadas as amostras, referentes aos picos que apareceram nas etapas de lavagem, eluição e regeneração da coluna com NaOH 1M, a fim de verificar se houve o aparecimento de NS1 em cada etapa do perfil cromatográfico.

3.2.3 Dot Blot (DB)

Dot Blot é uma técnica de biologia molecular para detectar biomoléculas. É considerada uma técnica que representa uma simplificação do método Western blot. Em um ponto blot, as biomoléculas a serem detectadas não são separadas por cromatografia. Em vez disso, uma gota contendo a molécula a ser detectada é aplicada diretamente sobre uma membrana, onde é feita uma detecção por sondas de anticorpos (STOTT, 1989).

A membrana de nitrocelulose (MN) (SIGMA Dura-blottm, com poro de 0,45 mm. Cat. N0 N 9641) foi dividida em partes de 11 x 7,5 cm, disposta para adição de 96 poços onde adicionou-se, em cada poço, 3 μ L de cada fração cromatográfica obtida nas corridas, bem como as amostras obtidas na concentração com Tubo Amicon 30 e 50 kDa. Nas MN foram adicionados sempre dois poços contendo o controle positivo (Solução com presença de NS1) e um controle negativo (Solução sem a presença de NS1). Os sítios livres de ligação de proteínas presentes foram bloqueados com 5% de leite desnatado em PBS + 0,05% de Tween20 por 60 minutos. Em seguida, as membranas foram lavadas três vezes por 10 min com PBS + 0,05% de Tween20, a fim de remover totalmente a solução de bloqueio, para posterior etapa de adição do anticorpo monoclonal Anti Dengue vírus NS1, anticorpo produzido em rato (Sigma-Aldrich) diluído (1/5000) em PBS + 0,05% de Tween20 por 1 hora. Após sucessivas lavagens com PBS + 0,05% de Tween20, seguiu-se incubação com anticorpo secundário, Anti-Mouse IgG, produzido em bode (SIGMA-ALDRICH) diluído (1/5000) em PBS + 0,05% de Tween20, acoplado a peroxidase por mais uma hora. Após lavagens sucessivas com PBS + 0,05% de Tween20, a membrana foi revelada com a solução de 30 mL com PBS + 0,01 g de 3,3' Diaminobenzidina tetrahidrocloreto (DAB) - Sigma + H₂O₂ + 0,04 g de Nitrato de Prata.

Neste trabalho, foram coletadas ao todo 316 amostras entre os ensaios cromatográficos e Tubo Amicon de 30 e 50 kDa. Essas amostras foram dispostas em 4 membranas de nitrocelulose diferentes, sendo o total de 96 pontos blot em cada membrana. As membranas

foram divididas pela metade, a fim de separar as amostras de cada corrida cromatográfica. Essas membranas foram chamadas de M-A (1ª Membrana – dividida em M-A-I e M-A-II), M-B (2ª Membrana – dividida em M-B-I e M-B-II), M-C-I (3ª Membrana – dividida em M-C-I e M-C-I) e a M-D (4ª Membrana – dividida em M-D-I e M-D-II).

3.3 Etapa de Dessalinização das Amostras Brutas de NS1-DENV2

O processo de Dessalinização se faz necessário anterior a etapa de concentração por liofilização, uma vez que, nas amostras brutas há a presença de sais oriundos do tampão PBS, para etapa de produção desta amostra. Nesta etapa, o sal é removido por um sistema de gel filtração, onde na coluna não há interação com a molécula-alvo e sim separação por tamanho. No caso as moléculas de sal ficam retidas na coluna e a amostra passa junto a solução de água (WALKER, 2009; PORATH E FLODIN, 1959);

A dessalinização das amostras foi realizada utilizando a coluna Hitrap Desalting Sephadex G25 de 5 mL no sistema FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatograph*) Contichrom da Knauer. As colunas foram previamente equilibradas utilizando água Milli-Q com fluxo de 0,5 mL/min. Foram coletados e utilizados 10 mL das Amostras brutas de NS1-DENV2 (A3, A4, A5 e A6) na etapa de Desalting. A dessalinização foi realizada com água Milli-Q, utilizando 1,5 mL de injeção da amostra bruta de NS1-DENV2, em um fluxo de 3 mL/min e coleta de 3 mL/ tubo. Entre as corridas, as colunas foram lavadas com água Milli-Q e ao final foram armazenadas em etanol 20%. Ao final desta etapa as amostras duplicaram seu volume inicial.

3.4 Etapa de Concentração da Amostra Bruta de NS1-DENV2

3.4.1 Tubo Amicon 30 e 50 kDa

Para etapa de concentração, foram realizadas centrifugações nos tubos Amicon de 15 mL, por separação de peso molecular em 30 e 50 kDa (SIGMA-ALDRICH). Foram utilizados nesta etapa de concentração somente as amostras brutas A1 e A2 de NS1-DENV2, pois possuíam maior concentração e volume. Dos 20 mL disponíveis da amostra A1 fornecida, foram utilizados aproximadamente 15,0 mL. Ao todo, foram realizadas 10 centrifugações, sendo 5 centrifugações no tubo Amicon de 50 kDa e 5 centrifugações nos de 30 kDa. Para cada etapa de centrifugação foram utilizados 3 mL da amostra inicial. As condições desta etapa foram: 20 min de centrifugação e velocidade de 3500 rpm.

Os 10 mL da amostra bruta A2, foram utilizados 3,0 mL para esta etapa de concentração, onde utilizou-se a variação de volume para cada centrifugação, e mantiveram-se constantes: o tempo de centrifugação de 15 min e a velocidade de 3500 rpm.

As condições iniciais utilizadas para cada amostra, bem como a velocidade de centrifugação podem ser observadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Dados Centrifugação Tubo Amicon 30 e 50 kDa

Etapa de concentração - Tubo Amicon					
Amostras	Concentração inicial (mg/mL)	Nº de Centrifugações	Velocidade (rpm)	Tubo	Condição Inicial
A1	0,35	5	3500	50	Volumes iguais
				30	Tempo: 20 min
A2	1,11	3	3500	50	Variação de volume
				30	Tempo: 15 min

Ao final das centrifugações coletaram-se os volumes que ficaram retidos no filtro (M50) e os volumes que passaram pelo filtro (m50). Em teoria o que ficou retido no filtro tem peso molecular maior que 50 kDa, enquanto o que passou pelo filtro tem peso molecular menor que 50 kDa. Os volumes obtidos nas amostras m50 de cada centrifugação no Tubo Amicon de 50 kDa, foram utilizados para se concentrar no Tubo Amicon de 30 kDa, onde ao final das centrifugações coletou-se os volumes que ficaram acima do filtro de 30 kDa [M50-30] e os volumes que passaram pelo filtro de 30 kDa [m30], de modo que, o que ficou retido no filtro tem peso molecular maior que 30 kDa, enquanto o que passou pelo filtro tem peso molecular menor que 30 kDa.

Esse estudo da alteração no volume inserido nos tubos Amicon tinha como propósito avaliar se a quantidade de volume presente nos tubos teria alguma influência quanto a passagem de proteínas pelo filtro. Ao final das centrifugações foram coletados os volumes retidos no filtro, bem como os volumes que passaram para posterior análises de eletroforese, a fim de averiguar se houve concentração da amostra de NS1, separando-a das demais proteínas presentes na solução bruta.

3.4.2 Liofilização das Amostras Brutas de NS1-DENV2

A etapa de liofilização é considerada um processo de estabilização, no qual uma substância é previamente congelada e então a quantidade de solvente (geralmente água) é reduzida, primeiro por sublimação e posteriormente por dessorção, para valores tais que impeçam atividade biológica e reações químicas; e passam pelos processos de congelamento

inicial, secagem primária e secagem secundária (MARQUES, 2008)

Esta etapa foi utilizada posteriormente a etapa de Desalting, uma vez que as proteínas não continham a presença de sal. A etapa de liofilização, foi utilizada a fim de se obter uma maior concentração das amostras brutas, visto a sua baixa concentração inicial. Nesta etapa foram utilizadas 20 mL de cada amostra (A3, A4, A5, A6 e A7). Cada amostra foi adicionada a um Tubo Falcon de 50 mL e congeladas inicialmente a -80 °C em um Freezer (DW-86L728 -80°C Ultra Low Temperature Freezer), em posição inclinada, a fim de se obter maior área de contato. Após o processo de congelamento inicial a -80 °C, as amostras foram adicionadas no liofilizador.

A liofilização foi feita em parceria com o grupo de pesquisa da Profa. Dra. Maria Izabel, no Laboratório de Biotecnologia e Biologia Molecular (LBBM) e o equipamento utilizado foi um liofilizador de bancada (modelo L-101, marca Liotop), que consiste basicamente de uma câmara de secagem acrílica cilíndrica e transparente. Na parte superior da câmara, há uma tampa em aço inox que acopla oito torneiras de silicone para o encaixe dos frascos (cones) de vidro com o sistema de alívio de vácuo e, no interior da câmara de secagem, há um suporte em aço inoxidável para quatro bandejas de inox. A temperatura de trabalho do liofilizador foi de -70 °C e tempo de liofilização para cada amostra foi em torno de 10 horas para concentrar as amostras.

3.5 Estratégias de purificação da NS1-DENV2 - Ensaios de purificação em colunas de leito fixo convencionais

O sistema FPLC - Contichrom comercializado pela empresa alemã Knauer, é utilizado para purificação de proteínas em larga escala. Este sistema permite a realização de ensaios em leito fixo (método *Batch Wizard*) e utilizando os métodos CaptureSMB (afinidade) e MCSGP (troca iônica) disponíveis no sistema. O FPLC (Figura 7) pode operar em modo contínuo, especificamente com duas colunas conectadas em série, desde que ambas as colunas sejam idênticas, a fim de aumentar a capacidade dinâmica da coluna.

Outro sistema utilizado no estudo foi o sistema em leito fixo constituído por: uma bomba peristáltica (Watson Marlow, Modelo Q 400), uma coluna cromatográfica (C 10/10 da GE Healthcare), empacotada com a fase estacionária (Procion Red MX-5B ligada a matriz de Quitosana Alginato Epoxidado - QAE), um coletor de frações (Buchi, Modelo C-660) e um espectrofotômetro (Thermo Scientific Biomat 3S).

Figura 7 - Visualização do sistema Contichrom - FPLC



Fonte: Próprio autor

Os experimentos cromatográficos com amostras concentradas na liofilização de NS1-DENV2 e diluídas no tampão de adsorção foram realizados com a injeção de um pulso de 1 mL de solução de proteína com concentração de 0,4 mg/mL e vazão de 0,8 mL/min.

Os ensaios de purificação da NS1-DEN2, foram realizados em duas colunas de afinidade (Hitrap Sepharose Concanavalina A – Sistema FPLC e Procion Red MX-5B - Coluna C10/10) e uma coluna de troca iônica (Hitrap QFF). Esse sistema é composto por: dois detectores UV, 6 válvulas, 3 bombas, sendo que uma delas é específica para o gradiente de eluição. As colunas foram acopladas próximas ao detector UV, o qual, registrou a absorbância no comprimento de onda de 280 nm para os perfis cromatográficos. Foram coletadas amostras de 30 em 30 segundos, a partir do aparecimento do pico nas diferentes etapas do perfil cromatográfico. Nos ensaios com o corante Procion Red MX-5B-QAE, foram coletadas amostras de 1 em 1 min através de um coletor de frações (Buchi, Modelo C-660) e todas as amostras desta corrida foram quantificadas pelo método de Bradford.

A proteína NS1 é considerada uma glicoproteína e de acordo com a literatura, a coluna de Concanavalina A é uma coluna de afinidade, utilizada para captura de biomoléculas glicosiladas incluindo glicoproteínas e glicolípidos (GE HEALTHCARE, 2017; MENDONÇA, 2003). As colunas que utilizam corantes imobilizados a matrizes cromatográficas, obtiveram resultados significativos quanto a purificação de proteínas típicas do soro humano, como IgG, que também é considerada uma glicoproteína, atuando como ligantes pseudobioespecíficos (GONDIM *et al.*, 2012; GONDIM *et al.*, 2014). Foram realizados ensaios em coluna comercial de troca iônica, a Hitrap QFF, que é classificada como resina aniônica.

Para os ensaios com as colunas de afinidade, no sistema Contichrom, as amostras

lioofilizadas de NS1-DENV2 foram as soluções de injeção. As condições dos experimentos foram: volume de injeção (1,0 mL), vazão (0,8 mL/min), tampão de adsorção (Fosfato de Sódio 25 mM e pH 5,9), tampão de eluição (NaCl 1,0 M acrescido ao tampão de adsorção), concentrações de proteínas (0,4 mg/mL). Nos ensaios com a Coluna de troca iônica, Hitrap QFF, as condições dos experimentos foram: volume de injeção (1,0 mL), vazão (0,8 mL/min), tampão de adsorção (TRIS-HCl 25 mM e pH 8,0), tampão de eluição (NaCl 1,0 M acrescido ao tampão de adsorção), concentrações de proteínas (0,4 mg/mL). Após o final dos ensaios cromatográficos, todas as amostras dos picos no perfil cromatográfico foram coletadas a fim de realizar as análises qualitativas de eletroforese (SDS-PAGE), Dot-Blot e quantificação de proteínas totais pelo método Bradford para verificar o potencial desses adsorventes na purificação da NS1-DENV2.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização inicial da amostra bruta com a proteína NS1-DENV2

4.1.1 Determinação de proteínas totais

Dos 7 meios de cultivo celular infectado (amostras brutas coletadas), foram realizados o método de Bradford para quantificação de proteínas totais, a fim de verificar a concentração inicial das amostras para posterior ensaios de purificação, cujos resultados estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Quantificação da amostra inicial por Bradford

Amostra	C (mg/mL)	V
A1	0,35	20 mL
A2	1,11	10 mL
A3	0,24	20 mL
A4	0,08	15 mL
A5	0,32	11 mL
A6	0,07	30 mL
A7	0,35	10 mL

C – Concentração em mg/mL

Vi – Volume das amostras brutas NS1-DENV2 coletadas

An – Amostras de NS1-DEN2 coletadas

Fonte: O Autor (2017)

Observa-se na Tabela 3, que as concentrações das amostras são pequenas para se trabalhar em sistemas cromatográficos, com exceção da amostra A2, pelo acréscimo de soro fetal bovino na etapa de produção da mesma, a qual esperava-se um aumento de concentração em relação as demais amostras que não tiveram adição de SFB. Essas concentrações menores dificultam o uso em etapas cromatográficas, uma vez que são necessários o uso de diluição das amostras em tampões para se realizar as etapas de adsorção e eluição em corridas cromatográficas. Em concentrações muito baixas, não seria possível identificar corretamente o perfil cromatográfico para as diferentes colunas utilizadas.

Para isso foi necessário realizar etapas de concentração das proteínas virais, utilizando a liofilização dessas amostras com concentrações menores, bem como a utilização dos Tubos Amicon de 30 e 50 kDa.

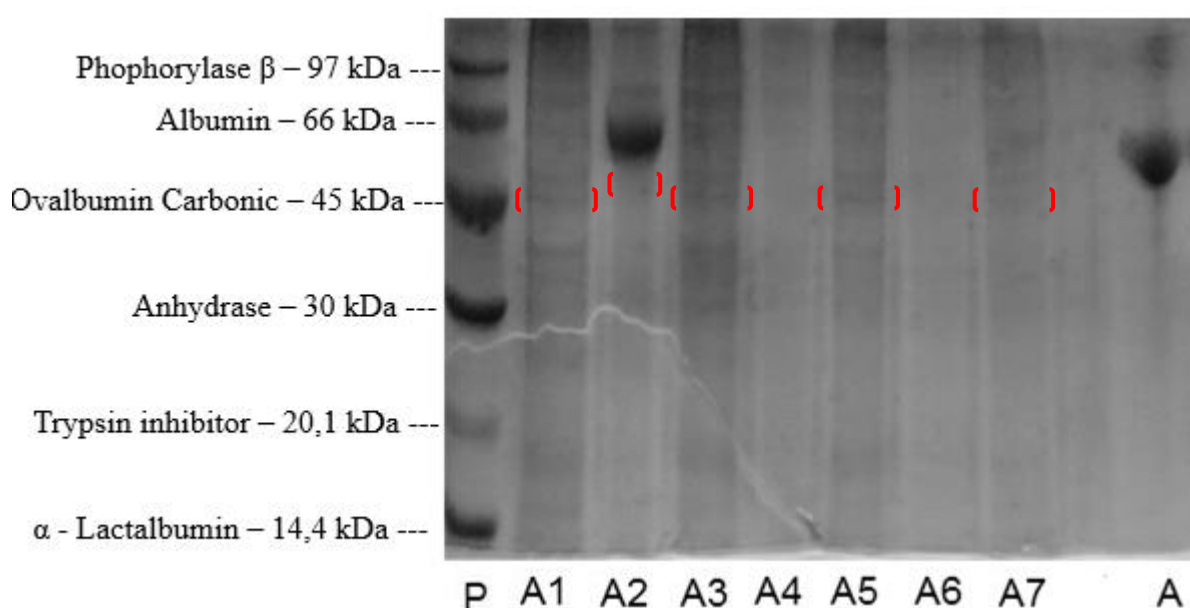
Salienta-se que as amostras A1 e A2, não foram utilizadas na etapa de concentração por liofilização, uma vez que, as mesmas foram utilizadas para a etapa de concentração com Tubos Amicon de 30 a 50 kDa, devido a quantidade maior de volume e concentração inicial

(Tabela 3).

4.1.2 Eletroforese (SDS-PAGE) das amostras brutas de NS1-DENV2

Todas as amostras brutas de NS1-DENV2 coletadas (A1, A2, A3, A4, A5, A6 e A7) foram analisadas por eletroforese SDS-PAGE com gel de 10%, utilizando padrão de baixo peso molecular (LMW) da GE Healthcare (EUA), conforme pode ser observado na Figura 8.

Figura 8 - Eletroforese das amostras de NS1-DENV2 coletadas em meio de cultura (Célula Vero) – Descrição dos poços: Padrão de proteínas de baixo peso molecular – P; Amostras de NS1- DENV2: A1, A2, A3, A4, A5, A6 e A7; Padrão de Proteína BSA - A



Analisando a eletroforese (Figura 8) pode se observar que as amostras brutas (A1, A2, A3 e A5), possuem bandas de proteínas próxima ao peso molecular da NS1 na forma monomérica (45-50 kDa), porém a banda é relativamente fraca, demonstrando a necessidade de realizar etapa de concentração com as amostras antes de se realizar ensaios cromatográficos, a fim de concentrar mais esta proteína na solução. Nas amostras brutas A4 e A6 em que a concentração inicial é baixa, quando comparado com as outras amostras coletadas (Tabela 3) foi possível observar que, quase não há proteínas aparecendo na eletroforese delas, evidenciando assim baixa concentração de proteínas presentes.

A partir da eletroforese foi possível perceber o aparecimento de outras proteínas, evidenciando a necessidade de purificação da NS1-DENV2 produzida em Célula Vero, onde conforme comentado anteriormente, nestas amostras brutas coletadas podem conter várias proteínas, que são produzidas para formar a NS1, como proteínas do envelope e membrana e a

presença de outras proteínas não estruturais, bem como a presença de albumina em decorrência da etapa de produção da NS1 em Células Vero. A presença de demais proteínas nas amostras brutas deve-se, segundo Lindenbach, *et al.* (2007) infecção do vírus no meio de cultivo celular o RNA viral forma uma poliproteína que contém 3 proteínas não estruturais (Capsídeo, Membrana e Envelope) e 7 proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5), sendo desta forma, justificável o aparecimento de outras proteínas na eletroforese (Figura 8) dos 7 meios de cultivo celular infectado (amostras brutas coletadas).

4.2 Concentração e Quantificação das Proteínas Virais

Foi analisado a diminuição do volume por tempo de liofilização (Tabela 4), uma vez que, a etapa de liofilização aumenta a concentração da amostra, a medida que o seu volume vai sofrendo diminuição por tempo de processo.

Tabela 4 – Dados obtidos na etapa de liofilização das amostras brutas de NS1-DENV2

Amostra	Ci (mg/mL)	Clio (mg/mL)	Vi	Vlio	Tempo Total
A3	0,24	2,22	20,0 mL	300 uL	13 horas
A4	0,08	0,30	20,0 mL	1,2 mL	8 horas
A5	0,32	0,70	20,0 mL	1,1 mL	10 horas
A6	0,07	0,41	30,0 mL	1,8 mL	8 horas
A7	0,35	0,80	20,0 mL	2,5 mL	7 horas

Ci – Concentração antes da liofilização em mg/mL

Clio – Concentração depois da liofilização em mg/mL

Vi – Volume das amostras brutas NS1-DENV2 antes da liofilização

Vlio – Volume das amostras brutas NS1-DENV2 depois da liofilização

An – Amostras de NS1-DENV2 coletadas

Fonte: O Autor (2017)

Observa-se que mesmo com o aumento da concentração das amostras, obtidas na etapa de liofilização, o volume ficou muito reduzido para realizar ensaios cromatográficos no sistema FPLC – Contichrom, uma vez que, o ideal seria ter amostras para injeção no sistema acima de 5,0 mL (ou 5000 µL). Esse volume parece ser alto, entretanto é considerado como um volume mínimo no interior das tubulações, que serão bombeadas até a coluna.

Na literatura, estudos relacionados a concentração utilizando Tubo Amicon de 30 kDa e 50 kDa, foram realizados para verificar o aumento no fator de concentração de proteínas, a partir da adição de 500 µL de BSA (1 mg/mL), em dois filtros de 30 e 50 kDa. Verificou-se que ambos os filtros possibilitaram uma maior concentração desta proteína, por volume de retido em uL, em 15 e 30 min de centrifugação. Outro fator de destaque foi a recuperação de 90% da BSA retida sem danificar a estrutura da proteína em 15 min de centrifugação. Neste

estudo destaca-se os melhores resultados para a retenção de BSA, em maior fator de concentração, o uso do Tubo Amicon de 15 mL e filtro de 30 kDa, nos tempos de centrifugação 15 e 30 min (MILLIPORE, 2003; MILLIPORE, 2014). Como as amostras brutas de NS1 (A1 e A2), possuem a presença de proteínas de diferentes pesos moleculares, assim como a presença de albumina (66 kDa), foi realizado o estudo da centrifugação dessas amostras, a fim de concentrar a proteína NS1, a partir da separação da albumina e demais proteínas presentes na solução.

4.2.1 Concentração da amostra bruta A1 utilizando Tubo Amicon 30 e 50 kDa

4.2.1.1 Centrifugação Tubo Amicon 15 mL com filtro de 50 kDa (A1-NS1-DENV2)

A Tabela 5 apresenta os dados de concentração de todas as amostras coletadas M50 e m50 e ainda o volume coletado após cada uma das 5 centrifugações.

Tabela 5 - Dados Coletados nas centrifugações – Tubo Amicon 50 kDa – Concentração inicial de 0,35 mg/mL

Amostras	Volume obtido	C (mg/mL)
Acima de 50 kDa		
M50 (1)	1,5 mL	0,70
M50 (2)	1,5 mL	0,70
M50 (3)	1,5 mL	0,70
M50 (4)	1,5 mL	0,70
M50 (5)	1,5 mL	0,70
Abaixo de 50 kDa		
m50 (1)	1,5 mL	0,15
m50 (2)	1,5 mL	0,14
m50 (3)	1,5 mL	0,15
m50 (4)	1,5 mL	0,15
m50 (5)	1,5 mL	0,15

Conforme pode ser observado na Tabela 5, todas as amostras coletadas retidas no filtro do tubo Amicon de 50 kDa (M50(i)) apresentaram concentração próxima de 0,70 mg/ml. Logo, a amostra inicial (A1-NS1-DENV2) foi concentrada aproximadamente 2 vezes, de 0,35 mg/mL concentrou para 0,70 mg/mL. O volume coletado foi aproximadamente 7,5 mL. Com volume e concentração interessante a amostra M50 foi utilizada no sistema FPLC. Entretanto, há de se salientar nesta amostra a presença de proteínas com peso molecular acima de 50 kDa.

Após realizar a eletroforese dessa amostra foi possível identificar quais proteínas não passaram realmente pelo filtro de 50 kDa.

Em relação ao volume das amostras que passaram pelos filtros de 50 kDa (amostras denominadas de m50), estas foram utilizadas em segunda etapa de centrifugação em tubos Amicon de 30 kDa.

Esta estratégia teve como objetivo concentrar a proteína NS1, pois a mesma apresenta peso molecular entre 45-48 kDa. Em teoria o que ficou retido no filtro de 50 kDa tem peso molecular maior que 50 kDa, enquanto o que passou pelo filtro tem peso molecular menor que 50 kDa.

4.2.1.2 Centrifugação Tubo Amicon 15 mL com filtro de 30 kDa

A Tabela 6 apresenta os volumes coletados na segunda etapa, bem como as concentrações obtidas ao final das centrifugações.

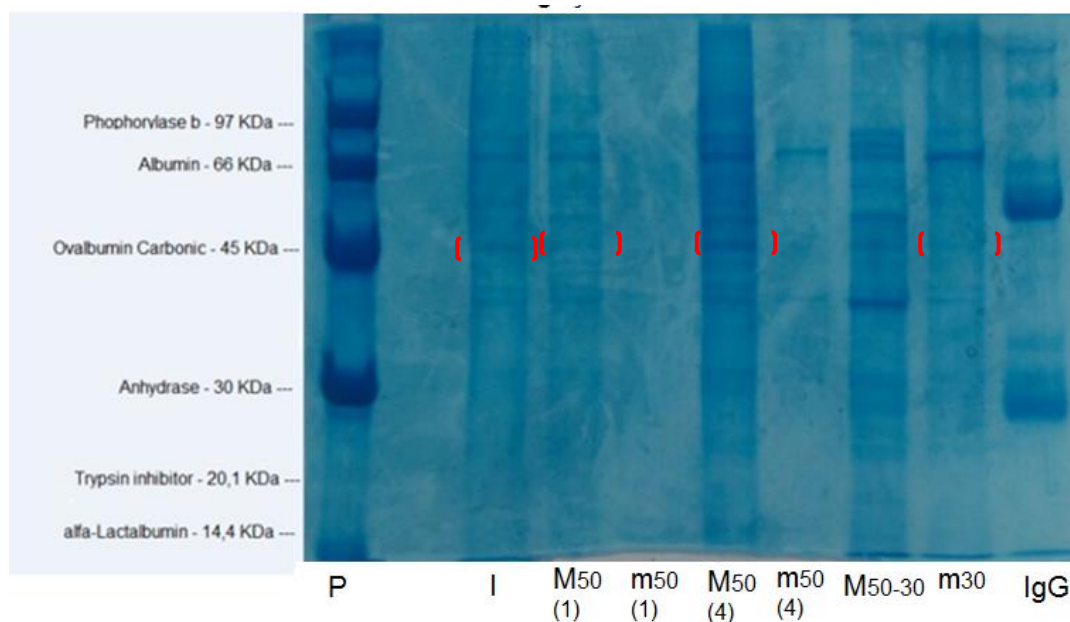
Tabela 6 - Dados Coletados nas Centrifugações – Tubo Amicon 30 kDa – Concentração inicial de 0,15 mg/mL

Amostras	Volume obtido	C (mg/mL)
Acima de 30 kDa		
M50-30 (1)	50 µL	1,98
M50-30 (2)	50 µL	1,99
M50-30 (3)	50 µL	2,00
Abaixo de 30 kDa		
m30 (1)	2,95 mL	0,06
m30 (2)	2,95 mL	0,06
m30 (3)	2,95 mL	0,06

Foi possível observar que a concentração aumentou para as amostras que ficaram acima de 30 kDa [amostras M50-30 (1-3)], quando comparados a concentração inicial de 0,15 mg/mL das amostras [m50 (1-5)]. Entretanto, o volume da amostra concentrada (M50-30) foi muito baixo, aproximadamente 50 µL. considerado muito pequeno para se utilizar em uma etapa de sistemas cromatográficos. Contudo, há a necessidade de avaliar a eletroforese dessas amostras para confirmar o aparecimento desta proteína.

Todas as amostras coletadas nas centrifugações foram analisadas por eletroforese SDS – Page com gel de 10%, utilizando padrão de baixo peso molecular (LMW), conforme pode ser observado na Figura 9.

Figura 9 - Eletroforese das amostras após as centrifugações com os tubos de amicon 30 e 50 kDa – Amostra analisada com NS1 sem SFB. Descrição dos poços: Padrão de proteínas de baixo peso molecular – P; Amostra bruta A1 de NS1-DENV2 – I; Amostras retidas no tubo Amicon de 50 kDa - M50, Amostras que passaram pelo tubo Amicon 50 kDa – m50; Amostras retidas no tubo Amicon de 30 kDa - m50-30, Amostras que passaram pelo tubo Amicon 30 kDa – m30, Padrão de Proteína IgG – IgG.



Analisando a eletroforese (Figura 9) observou-se que poucas bandas de proteínas apareceram na amostra inicial (I), amostra bruta A1 de NS1-DENV2 possivelmente devido à baixa concentração dessa amostra (0,35 mg/mL). As outras amostras que percorreram o gel de eletroforese foram: amostras M50(1), m50(1), M50(4), m50(4) antes e após a centrifugação dos tubos de 50 kDa e as amostras m50-30 e m30, antes e após a centrifugação com os tubos de 30 kDa.

Destaca-se que as centrifugações nos tubos da Amicon podem, ou melhor, deveriam concentrar as amostras que ficassem retidas nos filtros de 50 ou 30 kDa (M50 e M50-30). Aparentemente foi confirmado isso pelo valor das concentrações dessas amostras. Entretanto, quando correu a eletroforese (Figura 9) foi possível observar proteínas de diferentes pesos moleculares. Por exemplo, o poço da eletroforese que representa a amostra M50 apresentou proteínas com peso molecular em torno de 45 kDa e algumas proteínas com peso molecular próximo de 40 kDa. A amostra m50(4) que deveria apresentar proteínas apenas abaixo de 50 kDa, apareceu proteínas próximas de 66 kDa. Por isso, que a amostra M50-30 teve proteínas com peso molecular também próximos de 66 kDa. Essa mesma amostra (M50-30) apresentou

uma banda de proteínas entre 30 e 45 kDa, como pode ser observado na Figura 9. Este fato deve ter ocorrido, pois de acordo com a literatura recomenda-se o uso de uma membrana com um filtro (kDa) pelo menos duas vezes menor do que o peso molecular do soluto de proteína que se pretende concentrar (MILLIPORE, 2014).

Após essas análises, foi escolhido utilizar as amostras que ficaram acima do filtro de 50 kDa [amostras M50 (1-5)], com concentração média de 0,7 mg/mL e com volume total obtido, após as centrifugações, de 7,5 mL, para injetar na coluna de troca iônica, Hitrap QFF, no sistema FPLC – Contichrom, visto que, é possível que tivesse a proteína NS1 (destacado em vermelho na Figura 9).

4.2.2 Concentração da amostra bruta A2 utilizando Tubo Amicon 30 e 50 kDa

A amostra A2, com volume de 10 mL, foi a amostra que teve um acréscimo na porcentagem de adição de soro fetal bovino, ou seja, possui uma porcentagem de albumina maior em sua composição, além da proteína não estrutural NS1. Realizou-se a etapa de concentração com Tubo Amicon 30 e 50 kDa, para investigar meios de concentração que possam separar a albumina da amostra com NS1, bem como remover os demais contaminantes presentes na amostra bruta.

Sabe-se que a albumina possui peso molecular de 66 kDa (CANOA *et al.*, 2015), enquanto a NS1 possui na sua forma de monômero 45-48 kDa (STOHLMAN *et al.*, 1975; ALCON *et al.*, 2002). Este aspecto de peso molecular se faz importante, ao se utilizar os Tubos Amicon com diferentes filtros.

Na etapa de concentração por Tubos Amicon de 30 e 50 kDa foi utilizado 3,0 mL da amostra A2 de NS1-DENV2 com concentração em torno de 1 mg/mL. Estudou-se inicialmente a variação de volume para cada centrifugação e a redução do tempo de centrifugação para 15 min mantendo constante: a velocidade de 3500 rpm.

Esse estudo da alteração no volume inserido nos Tubos Amicon, bem como a redução no tempo de centrifugação de 20 para 15 min, tinha como propósito avaliar se a quantidade de volume presente nos tubos e a velocidade de centrifugação teriam alguma influência quanto a passagem de proteínas pelo filtro, uma vez que, na literatura obtiveram-se resultados satisfatórios para retenção de proteínas, com maior fator de concentração, em Tubos Amicon de 30 e 50 kDa, com 500 µL de volume inicial da amostra e 15 min de centrifugação (MILLIPORE, 2014).

Este estudo foi importante, pois nas centrifugações com a amostra A1 de NS1-DENV2 (Item 4.2.1), foi observado que proteínas acima de 50 kDa ultrapassaram o filtro do Tubo

Amicon de 50 kDa. Portanto, essa alteração foi apenas para observar o impedimento quanto a passagem dessas proteínas.

4.2.2.1 Centrifugação Tubo Amicon 15 mL com filtro de 30 e 50 kDa (A2-NS1-DENV2) com variação do volume inicial

Fracionou-se a amostra inicial (A2 de NS1-DENV2) em 3 diferentes volumes iniciais, 0,5 mL, 1 mL e 1,5 mL a serem utilizadas na centrifugação com Tubo Amicon 50 kDa.

Após as 3 centrifugações com o tubo amicon 50 kDa, separou-se as amostras coletadas acima do filtro [M50 (1), M50(2) e M50(3)], bem como, as amostras que passaram pelo filtro [m50 (1), m50(2) e m50(3)]. As amostras que passaram pelo filtro de 50 kDa seguiram para etapa de concentração com o Tubo Amicon de 30 kDa em 3 diferentes volumes de centrifugação, 300 µL, 600 µL e 900 µL.

Esta etapa de centrifugação se resume em concentrar a proteína NS1, de 3 diferentes volumes da amostra A2 de NS1-DENV2 que passaram pelo filtro do Tubo Amicon 50 kDa, pois a proteína NS1 na forma de monômero apresenta peso molecular entre 45-48 kDa.

Logo em seguida, realizou-se a determinação de proteínas totais pela metodologia de Bradford para todas as amostras coletadas, a fim de se verificar as concentrações obtidas (Tabela 7).

Tabela 7 - Amostras obtidas na centrifugação do Tubo Amicon de 50 kDa

Amostras Tubo Amicon 50 kDa	C (mg/mL)	Volume Coletado
M50 (1)	1,99	50 µL
M50 (2)	2,09	200 µL
M50 (3)	2,06	250 µL
m50 (1)	0,06	450 µL
m50 (2)	0,08	800 µL
m50 (3)	0,06	1250 µL

Foi possível perceber que a fração acima do filtro de 50 kDa, representada pelas amostras M50 (1-3), apresentaram concentração próxima de 2,0 mg/mL, ou seja, essas amostras concentraram cerca de duas vezes em relação a amostra inicial (A2 de NS1-DENV2). Entretanto, os volumes obtidos foram de 50 µL, 200 µL e 250 µL, representando cerca de 10%, 20% e 17% do volume filtrado, respectivamente.

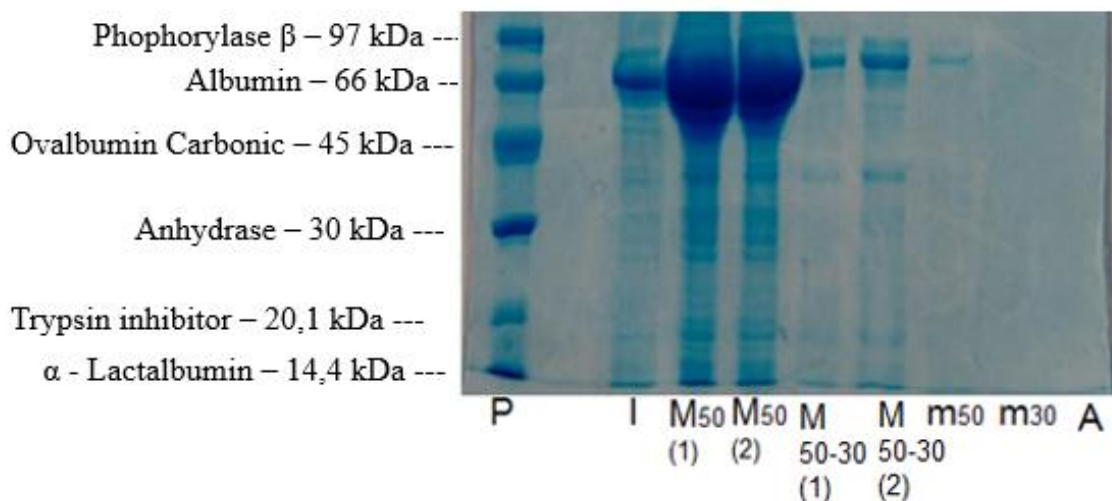
O mesmo cálculo foi realizado para as amostras obtidas através da centrifugação utilizando as amostras que passaram pelo filtro de 50 kDa [m30 (1-3)] e foram adicionadas em 3 diferentes volumes para centrifugação utilizando o tubo amicon de 30 kDa (Tabela 8).

Tabela 8 - Amostras obtidas na centrifugação do Tubo Amicon de 30 kDa

Amostras Tubo Amicon 30 kDa	C (mg/mL)	Volume Coletado
M50-30 (1)	0,12	40 µL
M50-30 (2)	0,24	50 µL
M50-30 (3)	0,58	50 µL
m30 (1)	Praticamente nulo	260 µL
m30 (2)	Praticamente nulo	550 µL
m30 (3)	Praticamente nulo	850 µL

Ao final destaca-se que a maior concentração (cerca de 2mg/mL) foi obtida nas amostras que ficaram acima do filtro de 50 kDa [M50 (1-3)]. Todas as amostras coletadas nas centrifugações foram analisadas pelo ensaio SDS – Page com gel de acrilamida 10%, utilizando padrão de baixo peso molecular (Figura 10), a fim de conferir quais proteínas ficaram retidas nos filtros de 30 e 50 kDa.

Figura 10 - Eletroforese das amostras após as centrifugações com os tubos de amicon 30 e 50 KDa – Amostra analisada com NS1 2% SFB. Descrição dos poços: Padrão de proteínas de baixo peso molecular – P; Amostra Inicial sem SFB – Inicial – I; Amostras retidas no tubo Amicon de 50 kDa - M50, Amostras retidas no tubo Amicon de 30 kDa – M30; Amostras que passaram pelo tubo Amicon 50 KDa – m50; Amostras que passaram pelo tubo Amicon 30 kDa – m30, Padrão de Proteína – Albumina – A.



Na Figura 10, foi possível perceber que realmente houve concentração de proteínas, por separação de peso molecular. As amostras mais concentradas, que ficaram acima do filtro de 50 kDa [M50 (1-2)], ficaram concentradas com albumina, de peso molecular 66 kDa quando comparado com a amostra inicial (I), A2 NS1-DENV2, de concentração 1,11 mg/mL. Nas amostras que ficaram retidas no filtro de 30 kDa [M50-30 (1-2)], aparece menos albumina e há o aparecimento de uma banda próxima a de 45 kDa, que tem como referência

na literatura como peso molecular da NS1.

Nota-se também que a variação de volume e o tempo nas etapas de centrifugação para ambos os filtros (30 e 50 kDa) ajudaram a impedir a passagem de proteínas, quando comparados a centrifugação feita com volume e tempo maior da amostra A1 de NS1-DENV2, no item 4.2.1, uma vez que, a eletroforese das amostras (Figura 9) havia demonstrado passagem de proteínas de 66 kDa em filtro de 30 e 50 kDa.

Outro ponto a destacar é o aparecimento de albumina em amostras que passaram pelo Tubo Amicon de 50 kDa. Isto deve-se também ao fato de que na literatura recomenda-se o uso de uma membrana com um filtro (kDa) pelo menos duas vezes menor do que o peso molecular do soluto de proteína que se pretende concentrar, uma vez que, devido a força de centrifugação, esta contribuiu por forçar a passar a proteína pelo filtro, tendo em vista que o filtro de 50 kDa é próximo ao peso molecular da albumina (66 kDa)

Destaca-se que a centrifugação permite um aumento na concentração da amostra, causada pela separação de proteínas por diferentes pesos molecular. Entretanto, o volume obtido para cada fração é baixo para ser trabalhado no sistema FPLC – Contichrom, onde conforme dito anteriormente, o ideal seria ter amostras para injeção no sistema com volumes acima de 5,0 mL (ou 5000 µL). Tratando-se de um volume ideal de trabalho para este sistema.

Visto que a ideia é obter uma pureza em torno de 90% da proteína não estrutural NS1, se fez necessários estudos em etapas cromatográficas para atingir a pureza desta proteína com a remoção das demais proteínas presentes na amostra.

Em relação a este contexto, utilizou-se sistemas cromatográficos com as colunas de afinidade, como a Hitrap Concanavalina A utilizado na literatura para glicoproteínas como é o caso da NS1 e Corante Procion Red MX-5B imobilizado a matriz de Quitosana Alginato Epoxidado – QAE, que possui afinidade por imunoglobulinas que são consideradas glicoproteínas. Também se utilizou uma coluna de troca iônica (Hitrap QFF), devido a sua aplicabilidade na purificação de proteínas para realizar a purificação das amostras brutas coletadas. Nestes ensaios utilizaram-se as amostras brutas coletadas com NS1-DENV2 após a etapa de liofilização (A3 e A5) e as amostras (A1 e A2), utilizadas na etapa de concentração com Tubos Amicon de 30 e 50 kDa. As amostras A4 e A6 após a liofilização não foram utilizadas, pois a concentração obtida no final desta etapa foi baixa (Tabela 3), para ser utilizada em processos cromatográficos. No caso da amostra A1 que passou pela etapa com o Tubo Amicon, foi utilizado as amostras que ficaram acima do filtro de 50 kDa [amostras M50 (1-5)], com concentração de 0,70 mg/mL. Para a amostra A2, com acréscimo de soro fetal bovino utilizou-se 5 mL da amostra que não foi utilizada nesta etapa de concentração, pois

obtinha uma concentração de 1,11 mg/mL.

4.2.3 Técnica Dot-Blot (DB) das amostras coletadas – Tubo Amicon 30 e 50 kDa – Etapa de Concentração – Amostras A1 e A2 de NS1-DENV2

Nos ensaios de concentração realizados com Tubo Amicon 30 e 50 kDa das amostras A1 e A2 de NS1-DENV2 resultaram em 28 amostras coletadas, sendo 16 amostras coletadas na centrifugação com a amostra bruta A1 (5 - Amostras retidas no filtro de 50 kDa [M50(1-5)]; 5 - Amostras que passaram no filtro de 50 kDa [m50(1-5)]; 3 - Amostras retidas no filtro de 30 kDa [M50-30(1-3)]; e 3 - Amostras que passaram no filtro de 30 kDa [m30(1-3)]) e 12 amostras coletadas na centrifugação com a amostra bruta A2, com acréscimo de soro fetal bovino (3 - Amostras retidas no filtro de 50 kDa [M50(1-5)]; 3 - Amostras que passaram no filtro de 50 kDa [m50(1-5)]; 3 - Amostras retidas no filtro de 30 kDa [M50-30(1-3)]; e 3 - Amostras que passaram no filtro de 30 kDa [m30(1-3)]). Destas 28 amostras, foram separadas 12 amostras para realização da técnica de Dot-Blot (Amostras utilizadas na SDS-PAGE-10% nas Figuras 9 e 10), a fim de confirmar a real presença de NS1 nas diferentes centrifugações com as amostras brutas A1 e A2.

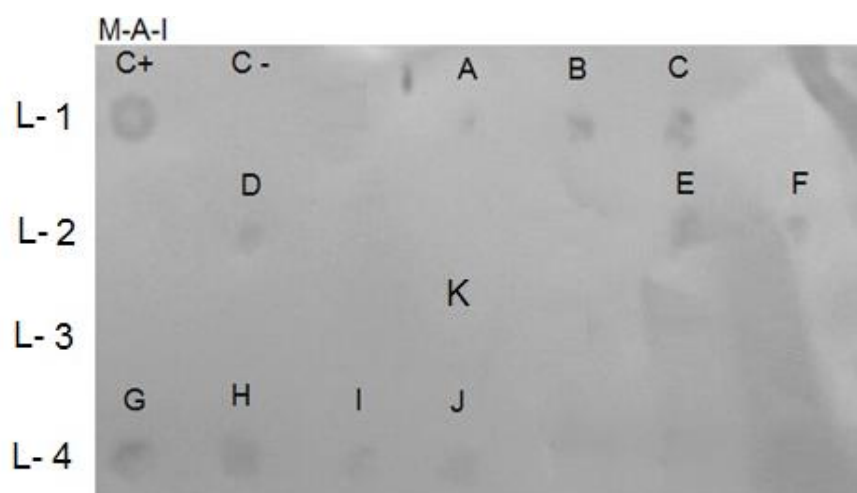
Na Figura 11 foi possível verificar a Membrana de Nitrocelulose (MN), utilizada para realizar a técnica de Dot-Blot (DB), das amostras coletadas nas centrifugações com Tubo Amicon 30 e 50 kDa, referente as amostras brutas A1 e A2 de NS1-DENV2, denominadas como Gel 1 e Gel 2. Nesta membrana foram adicionadas 3 uL de cada amostra como ponto blot, concomitantemente foram adicionadas nos dois primeiros pontos da membrana, um controle positivo (contendo a proteína NS1 – Amostra NS1- Recombinante) e um controle negativo (um meio que não tenha a proteína NS1 – Sobrenadante L-15, obtido em Célula Vero, sem a presença de NS1). Esta membrana foi chamada de Membrana (M-A-I).

Conforme visto na Figura 11, a membrana (M-A-I), identificou a presença de NS1 nas amostras B, C, D, E e F, obtidas na etapa de concentração, com Tubos Amicon de 30 e 50 kDa da Amostra A1 de NS1-DENV2. Nota-se que, foi possível confirmar a presença de NS1 nas amostras retidas em ambos os filtros 30 e 50 kDa (M50 e M50-30), bem como identificada a presença de NS1, na amostra m50(4), que na (Figura 9), não era possível identificar a banda de proteína próxima ao peso molecular da NS1 (45-50 kDa).

Neste contexto, foi possível perceber a presença de NS1 nas amostras G, H, I e J na membrana (M-A-I), obtidas na etapa de concentração, com Tubos Amicon de 30 e 50 kDa (Figura 27-Gel 2), da Amostra A2 de NS1-DENV2. Estas amostras se referem a proteínas que ficaram retidas nos filtros de 50 kDa ([M50(1 e 2)]) e as que passaram do filtro de 50 kDa

[m50] e ficaram retidas no filtro de 30 kDa ([M50-30(1 e 2).

Figura 11 - Descrição dos Dot-Blots visíveis na Membrana M-A-I, Letras: (C+) Controle Positivo – Presença de NS1 Recombinante; (C-) Controle Negativo – Sobrenadante L-15 sem a presença de NS1; (A) Amostra bruta inicial A1 de NS1-DENV2; (B) Amostra A1 retida no filtro de 50 kDa [M50 (2)]; (C) Amostra A1 retida no filtro de 50 kDa [M50(4)]; (D) Amostra A1 que passou do filtro de 50 kDa [m50(4)]; (E) Amostra A1 que passou na 1ª Centrifugação do filtro de 50 kDa [m50(1)] e ficou retida no filtro de 30 kDa [M50-30(1)]; (F) Amostra A1 que passou na 4ª Centrifugação do filtro de 50 kDa [m50(4)] e ficou retida no filtro de 30 kDa [M50-30(4)]; (G) Amostra A2 retida no filtro de 50 kDa [M50 (1)]; (H) Amostra A2 retida no filtro de 50 kDa [M50 (2)]; (I) Amostra A2 que passou na 1ª Centrifugação do filtro de 50 kDa [m50(1)] e ficou retida no filtro de 30 kDa [M50-30(1)]; (J) Amostra A1 que passou na 2ª Centrifugação do filtro de 50 kDa [m50(4)] e ficou retida no filtro de 30 kDa [M50-30(2)]; (K) Amostra Bruta inicial A2 de NS1-DENV2; Proteína de Referência Albumina – A.



Na terceira linha da membrana (M-A-I), foram adicionados Dot-Blots das amostras que passaram pelo filtro de 30 kDa (m30), para ambas as centrifugações das amostras A1 e A2. Entretanto, não foram perceptíveis a presença de NS1, uma vez que, o que passou pelo filtro de 30 kDa, foram proteínas abaixo do peso molecular de 30 kDa.

Destaca-se ainda que, nas amostras A1 de NS1-DENV2 retidas no filtro de 50 kDa [A1 [M50(1-5)] foi identificada a presença de NS1, sendo estas amostras utilizadas para ensaios cromatográficos em sistema FPLC, com coluna aniônica Hitrap QFF, de modo que esta proteína realmente está presente na amostra inicial injetada na coluna.

No caso da amostra A2 de NS1-DENV2, foi possível perceber a presença de NS1, nas proteínas retidas no filtro de 30 e 50 kDa (M50 e M50-30). Na amostra K da membrana (M-A-I), foi injetado um Dot Blot, referente a amostra bruta inicial A2, porém neste ponto ele

apresentou uma marcação muito leve, não sendo perceptível na Figura 11. Com isso, destaca-se que a presença de NS1 nesta amostra está em concentração muito baixa.

4.3 Estratégias de purificação da NS1-DENV2 em colunas de leito fixo convencionais

4.3.1 Purificação por cromatografia de troca iônica

Utilizou-se para os ensaios em cromatografia de troca iônica, a coluna aniônica Hitrap QFF (GE HEALTHCARE, 2017), no sistema FPLC, onde se utilizou-se cerca de 4 mL do volume das amostras A1 [M50 (1-5)], e 5 mL da Amostra A2 com NS1-DENV2. Ambas as amostras foram diluídas 2x em tampão Tris/HCl pH 8,0, sendo este o tampão utilizado para adsorção, a fim de gerar cargas negativas na amostra e serem atraídas pela coluna, uma vez que, a coluna QFF é aniônica e tem atração por íons negativos.

Na Tabela 9 foi possível verificar a concentração final após a diluição das amostras A1 (M50) e A2.

Tabela 9 - Dados da amostra diluída 2x de NS1 - DENV2

Amostra	Vi (mL)	Fator de Diluição	Vf (mL)	Ci (mg/mL)	Cf (mg/mL)
A1 [M50 (1-5)]	4,0	2x	8,0	0,70	0,35
A2	5,0	2x	10,0	1,11	0,63

Vi – Volume Inicial da amostra

Vf – Volume final da amostra após a diluição 2x com tampão

Ci – Concentração Inicial da amostra

Cf – Concentração final da amostra após a diluição com tampão

M50(i) – amostra retida no filtro após a centrifugação no Tubo Amicon de 50 kDa

Na etapa de eluição foi adicionado 1 M de NaCl e nos ensaios foram utilizados dois tipos de gradientes, em modo degrau e linear. Nestes ensaios foram injetados 1 mL da amostra, com vazão de 0,8 mL/min. É importante abordar a questão sobre a diferença na etapa de eluição, quanto a variação na concentração de sal nesta etapa, para eluição de proteínas, uma vez que, esta variação se faz necessária para estudar o perfil de eluição das proteínas nas diferentes concentrações salinas. O sistema FPLC - Contichrom se destaca devido automatização e praticidade em se alterar certos parâmetros com maior facilidade, como por exemplo, os tipos de gradiente de eluição.

Sendo assim, foram analisados três ensaios com a amostra bruta A2 de NS1-DENV2, sendo um ensaio em gradiente Linear (30 min) e dois ensaios com gradiente Degrau (35 e 32 min). Para a amostra A1 [M50 (1-5)], foram realizados dois ensaios em gradiente Degrau (35 e 32 min). Segundo Bresolin et al. (2009), o uso de gradiente em modo linear pode ser utilizado para se realizar experimentos iniciais, com biomoléculas, que não apresentam perfil

de eluição conhecido. Este estudo precede o uso de gradiente em modo degrau, uma vez que, este é aplicado em processos de purificação em larga escala, por ser mais reprodutível.

Nos ensaios em Gradiente Degrau 35 min, o perfil de eluição iniciou com concentração de 0,10M de NaCl (variação de concentração salina em 5 etapas). No caso do Gradiente Degrau 32 min este se iniciou com concentração de 0,15M de NaCl (variação de concentração salina em 4 etapas). No ensaio em Gradiente Linear 30 min, a concentração de sal (NaCl) aumenta de forma linear com o tempo (0-1M de NaCl).

4.3.1.1 Amostra A2 – NS1 DENV2 – Hitrap QFF – Gradiente Degrau 35 min

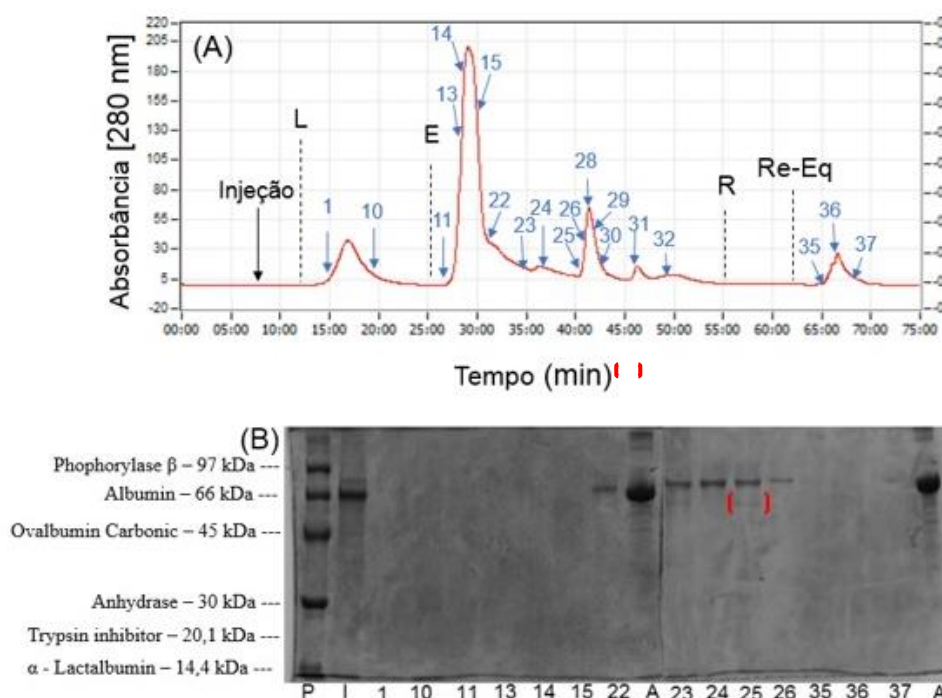
Neste primeiro ensaio, foi utilizado o gradiente degrau de 35 min, com aumento da concentração de NaCl em 5 etapas (1ª Etapa - 0,1 – 0,15 M, 2ª Etapa – 0,15 a 0,2M, 3ª Etapa – 0,2 – 0,4M, 4ª Etapa 0,5 – 1M e 5ª Etapa – 1 M) a fim de acompanhar a eluição das proteínas presentes na amostra inicial (A2 de NS1-DENV2) em cada uma das etapas do gradiente. A vazão utilizada foi de 0,8 mL/min. A Figura 12-A, demonstra o perfil cromatográfico obtido na corrida com gradiente degrau por 35 min, utilizando a amostra A2 de NS1-DENV2.

Nota-se o aparecimento de 5 picos (Figura 12-A), sendo 1 na etapa de lavagem com tampão, 3 na etapa de gradiente degrau com NaCl e um na etapa de Re-equilíbrio da coluna com o tampão de adsorção. Esta corrida resultou em 37 amostras coletadas.

A Figura 12-B demonstra os géis das amostras coletadas nesta corrida no sistema, com a amostra A2 diluída 2x em gradiente degrau 35 min. As amostras injetadas no gel foram escolhidas após quantificação por Bradford das 37 amostras coletadas da corrida, bem como, analisadas através do perfil cromatográfico da corrida no FPLC (Figura 12-A).

Na Figura 12-B, observou-se que não há o aparecimento de uma banda que mostre a NS1, visto que esta pode ter sido adsorvida pela coluna nesta etapa. Há ainda a presença de uma banda de proteína mais acentuada na faixa de peso molecular da albumina de 66 kDa (quando comparado ao padrão de proteína de referência adicionada no ultimo poço – Albumina - 1 mg/mL) nas amostras 22 a 26, que foram coletadas na quarta e quinta etapa do gradiente degrau com 0,5 M e 1M de NaCl.

Figura 6 – (A) Gradiente degrau 35 min – Amostra A2 – NS1 DENV2. Condições de corrida: vazão de 0,8 mL/min, injeção de 1,0 mL da amostra com concentração de 0,63 mg/mL diluída em tampão Tris-HCl pH 8,0 e eluição com tampão de Tris-HCl pH 8,0 + 1M NaCl. (B) SDS-PAGE 10% – Gradiente degrau 35 min. Descrição dos poços da eletroforese: Padrão de baixo peso molecular – P, Amostra Inicial – I, Amostras 1 e 10 (Lavagem), 11 à 13 (1ª Etapa gradiente degrau – 0,10 – 0,15 M de NaCl), 14 à 15 (2ª Etapa – 0,15 – 0,20 M de NaCl), 22 à 25 (4ª Etapa – 0,5 – 1M de NaCl), 26 (5ª Etapa – 1M de NaCl), 35 a 37 (Regeneração – 1M de NaOH), Proteína de Referência Albumina – A.



A Tabela 10 apresenta o balanço de massa por etapa do perfil cromatográfico do primeiro ensaio com a amostra A2 de NS1-DENV2 em Gradiente Degrau 35 min.

Tabela 10 - Balanço de massa por etapa - Gradiente Degrau 35 min - A2-NS1-DENV2

Etapa	Massa (mg)	Porcentagem (%)
Injeção	0,63	100,00
Adsorção	0,00	0,00
Lavagem	0,10	15,41
Eluição	0,49	77,84
Regeneração	0,04	6,75
Total	0,63	100,00

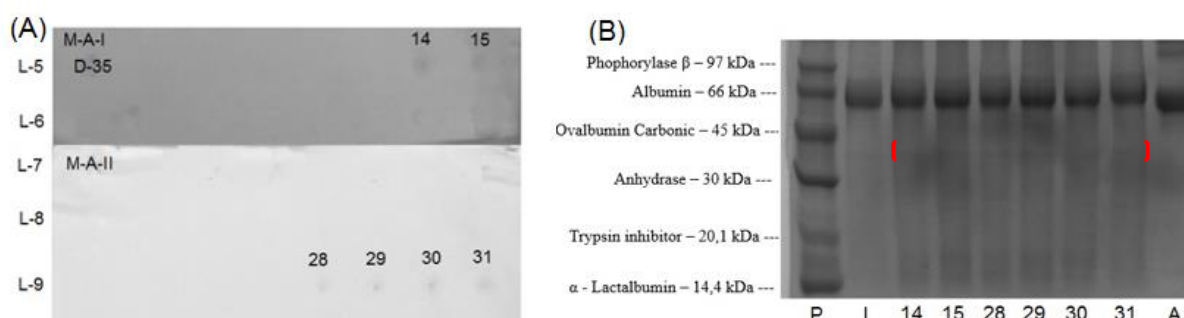
A partir da eletroforese (Figura 12-B), o perfil cromatográfico (12-A) e o balanço de massa (Tabela 10) foi possível perceber que neste ensaio utilizando tampão Tris-HCl pH 8,0 25 mM, a coluna teve afinidade pela albumina e demais proteínas presentes na amostra inicial,

visto que cerca de 85% do que foi injetado, foi adsorvido pela coluna Hitrap QFF. Este fato comprova-se pela Figura 19-B, uma vez que, a albumina aparece removida na quarta etapa do gradiente degrau de eluição, com cerca de 0,5 M de NaCl. Destaca-se que a albumina possui pI de 4,7 e acima deste ponto as cargas líquidas desta proteínas estão negativas, sendo favorecidamente adsorvida pela coluna mediante o uso da carga líquida do ligante com pH 8. Utilizando o gradiente Degrau de 35 min foi possível eluir da coluna cerca de 78% de proteínas, sendo a maior quantidade de proteínas eluída nas duas primeiras etapas do gradiente Degrau. Observou-se que esta coluna adsorveu a proteína NS1, uma vez que, esta aparece nas amostras da etapa de eluição (23 e 25 - destacado em vermelho na Figura 12-B).

Contudo, observa-se que a coluna, também teve certa afinidade pela albumina, visto que, nas etapas de eluição foi possível perceber uma maior quantidade desta proteína sendo eluída da coluna. A banda fraca de NS1 deve-se a baixa concentração, pela diluição ocorrida nas etapas cromatográficas, uma vez que, a amostra inicial possui uma baixa concentração desta proteína.

Desta forma, se fez necessário confirmar a presença da proteína NS1 nas amostras coletadas, a partir da técnica de Dot-Blot (Figura 13-A).

Figura 7 - (A) Dot-Blot - Descrição: amostras 14, 15, 28, 29, 30 e 31, indicando as que marcaram a presença de NS1 de acordo com a membrana utilizada na técnica de Dot Blot (M-A-I e M-A-II). (B) SDS-PAGE 10% – Amostras que marcaram NS1. Descrição dos poços da eletroforese: Padrão de baixo peso molecular – P, Amostra Inicial – I, Amostras 14 a 15 (2ª Etapa – 0,15 – 0,20 M de NaCl), 28 a 30 (4ª Etapa – 0,5 – 1M de NaCl), 31 (5ª Etapa – 1M de NaCl), Proteína de Referência Albumina – A.



Sendo assim, na Figura 13-A, foi possível perceber a presença de NS1 nas amostras 14, 15, 28, 29, 30 e 31, referente aos picos da etapa de eluição com Gradiente Degrau 35 min, na membrana (M-A-I e M-A-II). Na linha 5 (L-5), da Figura 13-A, foram também adicionadas amostras referentes ao pico formado na etapa de lavagem (amostras 4, 5, 7 e 9), porém não foi possível ver a presença de NS1, justificando o fato de que outras proteínas possam ter sido removidas nesta etapa e que praticamente toda NS1 presente na amostra injetada tenha sido adsorvida pela coluna.

Diante disso, nota-se na Figura 13-B, que há a presença da proteína NS1 nestas amostras, que foram concentradas utilizando um Vivaspín (GE Healthcare – USA) de 5 kDa, a fim de não interferir nas proteínas presentes nestas frações. Entretanto, observa-se que também houve adsorção de albumina presente na amostra inicial. Isto deve-se em virtude das condições utilizadas com tampão Tris-HCl pH 8,0, que favorece a adsorção de albumina, uma vez que, seu ponto isoelétrico é de 4,7, ou seja, esta também estava com cargas negativas e foi atraída pela coluna Hitrap QFF.

4.3.1.2 Amostra A2 – NS1 DENV2 – Hitrap QFF – Gradiente Linear 30 min

O segundo ensaio ocorreu nas mesmas condições da corrida anterior, alterando o perfil do gradiente para linear por 30 min. Este fator foi levado em consideração, uma vez que, para etapas que antecedem processos cromatográficos contínuos, são realizadas em corridas com gradiente linear, para os métodos (*Batch*) utilizando apenas uma coluna. Outro fator foi a possibilidade de observar a eluição de proteínas em um gradiente que ocorre de forma regular (Gradientes Lineares). Nesta etapa a concentração de sal (NaCl) vai aumentando de forma linear ao passar do tempo. A vazão utilizada foi de 0,8 mL/min. A Figura 14 demonstra o perfil cromatográfico obtido na corrida com gradiente linear por 30 min e os resultados analíticos SDS-PAGE e Dot-Blot (DB) das frações cromatográficas.

Neste ensaio (Figura 14-A) houve um aparecimento de um pico relativamente baixo na etapa de lavagem, enquanto aos 24 min da etapa de eluição começou a se formar um pico significativo. Este fato deve-se que a maioria das proteínas que foram adsorvidas na coluna, apareceram na etapa de eluição, conforme pode ser visto na Tabela 11, onde praticamente todas proteínas adsorvidas saíram na eluição, haja vista que o balanço de massa (massa de proteínas que entrou = massa de proteínas que saíram) fechou, ou seja, tudo que entrou (injetado) na coluna saiu na eluição (89,63%).

Figura 8 – (A) Gradiente Linear 30 min – Amostra A2 – NS1 DENV2 diluída 2x. Condições de corrida: vazão de 0,8 mL/min, injeção de 1,0 mL da amostra com concentração de 0,63 mg/mL diluída em tampão Tris-HCl pH 8,0 e e eluição com tampão de Tris-HCl pH 8,0 + 1M NaCl. (B) SDS-PAGE 10% – Gradiente linear 30 min. Descrição dos poços: Padrão de baixo peso molecular – P, Amostra Inicial – I, Amostras 38 e 42 (Lavagem), 43 á 52 (1º Pico – Eluição), 53 à 57 (2º Pico – Eluição), 58 à 62 (3º Pico – Eluição), 65 e 66 (Regeneração – 1M de NaOH), Proteína de Referência Albumina – A.

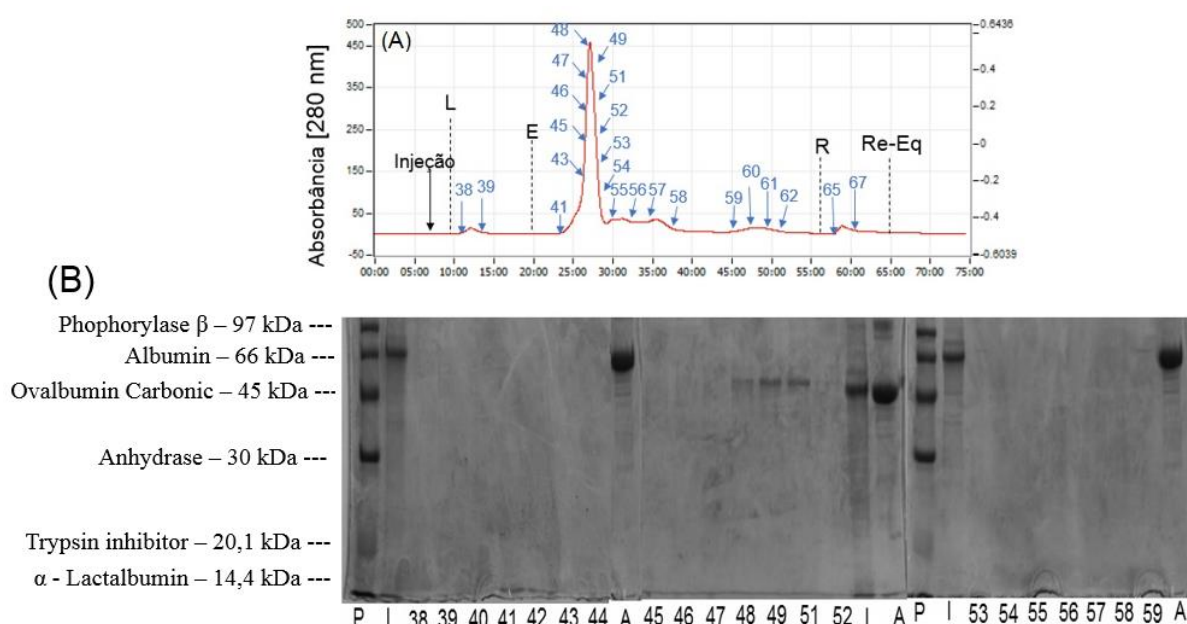


Tabela 11 - Balanço de massa por etapa - Gradiente Linear 30 min - A2-NS1-DENV2

Etapa	Massa (mg)	Porcentagem (%)
Injeção	0,63	100,00
Adsorção	0,00	0,00
Lavagem	0,03	4,14
Eluição	0,56	89,63
Regeneração	0,02	4,10
Total	0,61	97,87

A Figuras 14-B é referente aos géis das amostras coletadas na corrida com a amostra A2 diluída 2x em gradiente linear 30 min. As amostras injetadas no gel foram escolhidas após a quantificação por Bradford das 33 amostras coletadas em toda corrida, bem como, analisadas através do perfil cromatográfico da corrida no FPLC (Figura 14-A). Observa-se que as amostras 38, 39, 40, 41 e 42 são referentes a etapa de lavagem com tampão, porém não houve o aparecimento de proteínas, tendo em vista que, praticamente as proteínas presentes na amostra inicial, foram adsorvidas pela coluna (Tabela 11). As amostras 43 e 44 são referentes ao início do gradiente linear e também não houve o aparecimento de proteínas (albumina e

NS1) nesta etapa. Nas amostras 48, 49 e 51 houve o aparecimento de uma banda de proteína mais acentuada na faixa de peso molecular da albumina de 66 kDa (quando comparado ao padrão de proteína de referência adicionada no ultimo poço – Albumina - 1 mg/mL).

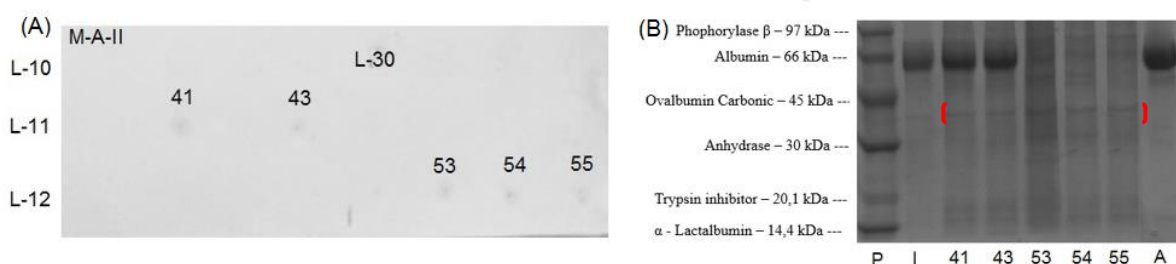
As amostras 53 a 59 (Figura 14-B) são da fase de eluição, cujo o tempo foi de 24:20 min até 28 min da corrida. Estas amostras são no tempo em que a concentração de NaCl é maior. Foi possível perceber bandas leves da presença de albumina, nas amostras 53 e 59, nesta etapa da eluição, porém não há o aparecimento de NS1. Na amostra inicial (I), a banda referente a NS1 não é bem visível (destacado em vermelho na Figura 13-B), evidenciando desta forma que, durante a corrida não demonstra o aparecimento da NS1, pois as amostras ficaram muito diluídas ao final da coleta.

Sendo assim, a partir das eletroforeses (Figura 14-B), perfil cromatográfico (Figura 14-A) e o balanço de massa (Tabela 11), Foi possível perceber que neste ensaio, na fase de lavagem, utilizando tampão Tris-HCl pH 8,0 25 mM, ocorreu forte afinidade pela albumina e demais proteínas presentes na amostra inicial, visto que, cerca de 96% do que foi injetado, foi adsorvido pela coluna Hitrap QFF.

Nota-se a presença do aparecimento em maior quantidade de albumina (Figura 14-B), no início do gradiente linear, referente ao primeiro pico da eluição, que corresponde a cerca de 90% da eluição de proteínas da coluna. Isto demonstra que boa parte das proteínas que ficaram retidas na amostra, sofreram eluição com pequena concentração de sal (NaCl), uma vez que, cerca 4% do total restante de proteínas ainda retida na coluna, foi removida na etapa de regeneração com 1 M de NaOH. Assim como no primeiro ensaio com a amostra A2 de NS1-DENV2, com gradiente Degrau 35 min, a etapa de lavagem para ambos os ensaios (Figura 12-A e Figura 14-A), com Tampão Tris-HCl pH 8,0, favorece a adsorção na coluna Hitrap QFF da maioria das proteínas presentes na amostra inicial.

Foi possível observar na técnica de Dot-Blot (Figura 15-A), que na etapa de eluição foi possível verificar a presença de NS1, nas amostras correspondentes ao primeiro pico da eluição (41 e 43), bem como, nas amostras 53, 54 e 55, coletadas a partir de 25 min de eluição com gradiente linear 30 min (0-1M de NaCl). A partir disso foi possível destacar que houve adsorção significativa de NS1 na coluna Hitrap QFF, pois observou-se que poucas proteínas foram removidas na etapa de lavagem (Pico 1) neste ensaio.

Figura 9 - (A) Dot-Blot - Descrição: amostras 41, 43, 53, 54 e 55, indicando as que marcaram a presença de NS1 de acordo com a membrana utilizada na técnica de Dot Blot (M-A-II). (B) SDS-PAGE 10% – Amostras que marcaram NS1. Descrição dos poços: Padrão de baixo peso molecular – P, Amostra Inicial – I, Amostras 41 e 43 (1º Pico – Eluição), 53 a 55 (2º Pico – Eluição), Proteína de Referência Albumina – A.



Na linha 10 (L-10), da Figura 15-A, foram também adicionadas amostras referentes ao pico formado na etapa de lavagem (Amostras 38, 39 e 40), porém não foi possível ver a presença de NS1, justificando o fato de que outras proteínas possam ter sido removidas nesta etapa e que praticamente toda NS1 presente na amostra injetada tenha sido adsorvida pela coluna. Nesta condição foi possível verificar uma adsorção significativa de NS1, uma vez que, observou-se cerca de 5 amostras com a presença de NS1.

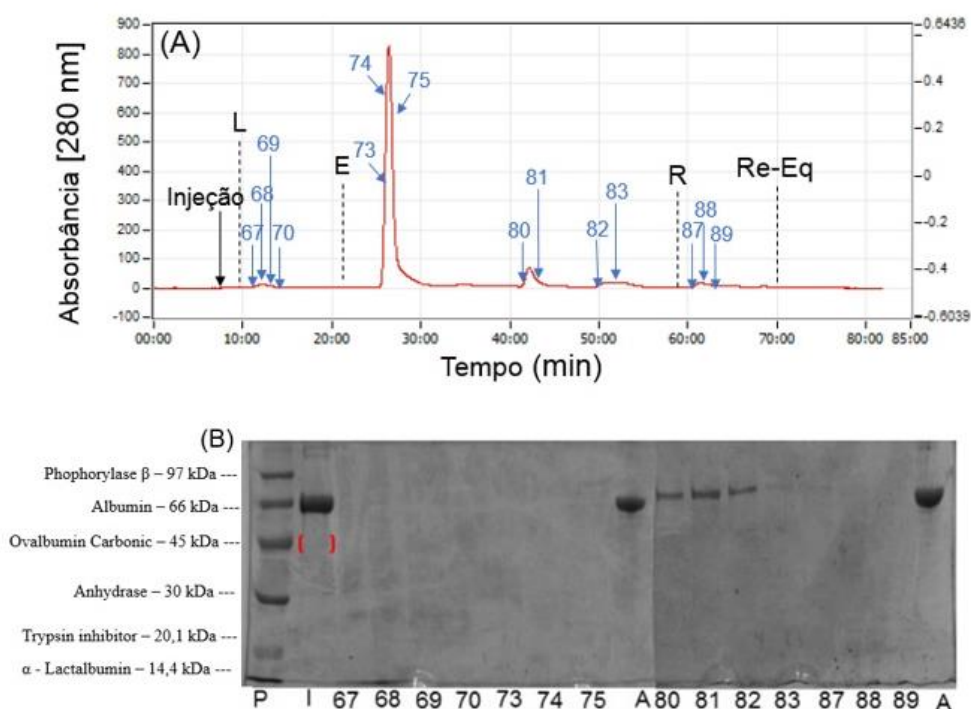
A partir da concentração das amostras que marcaram a presença da proteína NS1 (Figura 15-A), com o Vivaspín (GE Healthcare – USA) de 5 kDa, Foi possível notar, na Figura 15-B, que ocorreu adsorção de NS1. Contudo, observa-se que no primeiro pico da eluição, há a presença de albumina, evidenciando que esta também foi adsorvida nas condições utilizadas com tampão Tris-HCl pH 8,0, porém nas amostras 53, 54 e 55 a presença desta proteína diminuiu. A partir disso comprova-se que a adsorção de NS1 foi significativa, porém não houve separação total das demais proteínas presentes na amostra inicial. Nota-se que a partir do pI da NS1 de 5,8 era esperado a adsorção significativa, uma vez que, a carga líquida do ligantes estava negativa devido as condições em pH 8,0 do tampão de adsorção.

4.3.1.3 Amostra A2 – NS1 DENV2 – Hitrap QFF – Gradiente Degrau 32 min

Após analisar as diferenças entre o primeiro e segundo ensaio, com diferentes perfis de gradiente, buscou-se realizar o terceiro ensaio com diminuição do tempo do gradiente de grau, ao diminuir esta etapa para 4 gradientes com aumento na concentração de sal (NaCl) para cada etapa (1ª Etapa - 0,15 – 0,20 M, 2ª Etapa – 0,20 a 0,40M, 3ª Etapa – 0,5 – 1M, 4ª Etapa – 1 M), quando comparado as 5 etapas realizadas na primeira corrida com a amostra A2 de NS1-DENV2, tendo em vista a necessidade de aplicar concentrações diferentes, a fim de

avaliar o perfil de eluição das proteínas presentes na amostra inicial. A vazão utilizada foi de 0,8 mL/min. A Figura 16, demonstra o perfil cromatográfico obtido na corrida com gradiente degrau por 32 min e os resultados analíticos SDS-PAGE e Dot-Blot.

Figura 10 - (A) Gradiente degrau 32 min – Amostra A2 – NS1 DENV2. Condições de corrida: vazão de 0,8 mL/min, injeção de 1,0 mL da amostra com concentração de 0,63 mg/mL diluída em tampão Tris-HCl pH 8,0 e eluição com tampão de Tris-HCl pH 8,0 + 1M NaCl. (B) SDS-PAGE 10% – Gradiente degrau 32 min. Descrição dos poços da eletroforese: Padrão de baixo peso molecular – P, Amostra Inicial – I, Amostras 67 e 70 (Lavagem), 73 á 75 (1ª Etapa gradiente degrau – 0,15 – 0,20 M de NaCl), 80 e 81 (3ª Etapa – 0,5 – 1 M de NaCl), 82 e 83 (4ª Etapa – 1M de NaCl), 87 a 89 (Regeneração – 1M de NaOH), Proteína de Referência Albumina – A.



Neste ensaio (Figura 16-A) a concentração de NaCl no gradiente degrau foi de 0,15 M. Este parâmetro se fez necessário para obter a proteína NS1 mais concentrada, com remoção das demais proteínas. Na Figura 16-A houve um aparecimento de um pico relativamente baixo na etapa de lavagem, assim como no ensaio com gradiente linear a maioria das proteínas que foram adsorvidas na coluna, saíram na etapa de eluição a partir do aparecimento de um pico significativo aos 25 minutos. Este fato é confirmado a partir do balanço de massa realizado para cada etapa deste ensaio na Tabela 12. Nota-se pela Figura 16-A, que após os 40 min, na etapa do gradiente com 0,5M de concentração de NaCl, houve a formação de outro

pico. Ambos os picos foram coletados e esta corrida resultou em 27 amostras coletadas.

Tabela 12 - Balanço de massa por etapa - Gradiente Degru 32 min - A2-NS1-DENV2

Etapa	Massa (mg)	Porcentagem (%)
Injeção	0,63	100,00
Adsorção	0,00	0,00
Lavagem	0,02	2,77
Eluição	0,59	94,58
Regeneração	0,01	1,78
Total	0,62	99,13

Na Figura 16-A foi possível observar que, assim como no primeiro ensaio, com a amostra A2 de NS1-DENV2 diluída 2x em gradiente degrau 35 min, neste terceiro ensaio a maior quantidade de proteínas foi eluídas em baixa concentração salina (1ª Etapa do Gradiente Degrau – 0,15M). Desta forma Foi possível destacar que a eluição das proteínas ocorreu sob baixas concentrações salinas e não houve distinção quanto ao tipo de gradiente.

A Figura 16-B é referente aos géis das amostras coletadas na corrida no sistema, com a amostra A2 de NS1-DENV2 diluída 2x em gradiente degrau 32 min. As amostras injetadas no gel foram escolhidas após a quantificação por Bradford das 27 amostras coletadas em toda corrida, bem como, analisadas através do perfil cromatográfico da corrida no FPLC (Figura 16-A). As amostras 67, 68, 69 e 70 são referentes à fase de lavagem as amostras 73, 74 e 75, são amostras coletadas no início da primeira etapa do degrau de NaCl com concentração de 0,15 M. Em todas as amostras, não foi possível identificar bandas de proteínas (albumina e NS1).

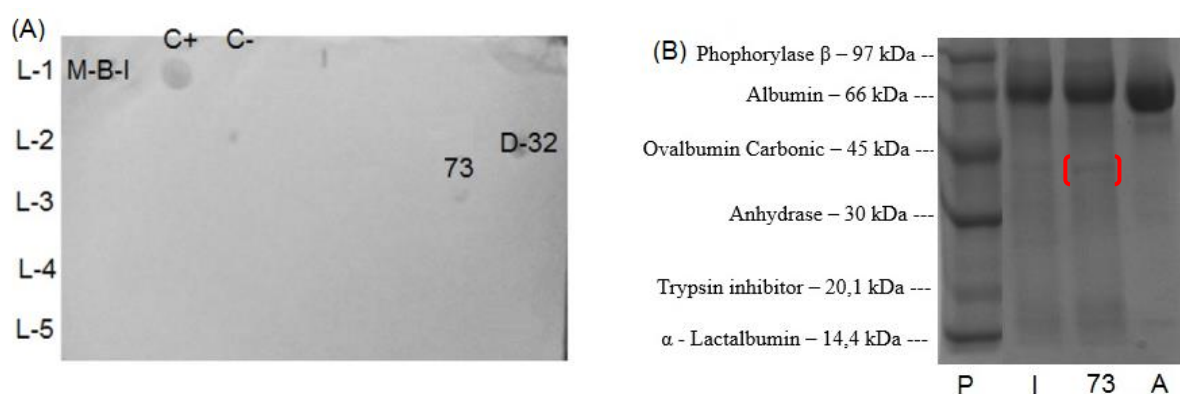
Ainda na Figura 16-B, as amostras 80 e 81 são da quarta etapa do gradiente degrau com concentração de 0,5 M. Foi possível perceber o aparecimento de albumina nesta concentração. A amostra 82 foi coletada com 1 M de NaCl. Nas amostras 83 e 87 aparece uma banda leve de albumina, porém não foi possível perceber o aparecimento de uma banda relativa a NS1. As amostras 87, 88 e 89 são da etapa de regeneração com NaOH 1M, onde não houve aparecimento de proteínas (albumina e NS1), tendo em vista que nesta etapa foram removidas somente 1,78% das proteínas adsorvidas na coluna. O fato de não aparecer NS1 nas amostras, ocorreu devido a baixa concentração desta proteína na amostra inicial A2 de NS1-DENV2 (I), (a banda referente a NS1 não é bem visível destacado em vermelho na Figura 16-B), evidenciando desta forma que, durante a corrida não demonstra o aparecimento da NS1, pois as amostras ficaram muito diluídas.

A partir das eletroforeses (Figura 16-B), o perfil cromatográfico (Figura 16-A) e o

balanço de massa (Tabela 12), foi possível perceber que neste ensaio, na fase de lavagem, utilizando tampão Tris-HCl pH 8,0 25 mM, ocorreu forte afinidade pela albumina e demais proteínas presentes na amostra inicial, visto que, cerca de 97% do que foi injetado, foi adsorvido pela coluna Hitrap QFF. Todavia, foi possível perceber o aparecimento em maior quantidade de albumina, no começo da terceira etapa do gradiente degrau, com 0,5 M de NaCl, referente ao segundo pico da eluição que corresponde a cerca de 6,5% da eluição de proteínas retidas na coluna. Assim como nos ensaios anteriores com a amostra A2 de NS1-DENV2, com gradiente degrau 35 min e linear 30 min, a etapa de lavagem neste ensaio (Figura 16-A) favorece a adsorção na coluna Hitrap QFF da maioria das proteínas presentes na amostra inicial (A2 de NS1-DENV2)

A Figura 17-A corresponde a toda a membrana (M-B-I), pois nesta primeira parte da membrana, contem todas as amostras do terceiro ensaio, realizados com a amostra A2 de NS1-DENV2 diluída 2x em Tampão Tris/HCl pH 8,0, com Gradiente Degrau 32 min, em sistema FPLC, utilizando coluna aniônica Hitrap QFF.

Figura 11 - (A) Dot-Blot - (C+) Controle Positivo – Presença de NS1 Recombinante; (C-) Controle Negativo – Sobrenadante L-15 sem a presença de NS1; Descrição: amostra 73, indicando a presença de NS1 de acordo com a segunda membrana utilizada na técnica de Dot Blot (M-B-II). (B) SDS-PAGE 10% – Amostra que marcou NS1. Descrição dos poços da eletroforese: Padrão de baixo peso molecular – P, Amostra Inicial – I, Amostra 73 (1ª Etapa – 0,15 – 0,20 M de NaCl, Proteína de Referência Albumina – A.



Neste ensaio, não se verificou a presença de NS1 nas eletroforeses (Figura 16-B), das amostras coletadas. Foram adicionadas na membrana (M-B-I) as 27 amostras coletadas neste ensaio, tendo início no começo da Linha 3 (L-3) até o final da Linha 5 (L-5), na membrana (M-B-I) da Figura 17-A.

Observa-se que somente a amostra 73 marcou a presença de NS1, justamente na primeira etapa do Gradiente degrau, com 0,15M de NaCl. Na eletroforese deste ensaio (Figura

16-B), não se verificou a presença de NS1 nas amostras coletadas ao longo do perfil. Somente era possível perceber a presença de albumina nas amostras referentes ao segundo pico da eluição. Contudo, pela técnica Dot-Blot, foi possível confirmar que uma das amostras presentes na eluição confirmou a existência da proteína NS1. Logo neste ensaio, a adsorção desta proteína não foi significativa, uma vez que, dos 94,56% das proteínas que foram eluídas da coluna na etapa de eluição, somente uma das amostras coletadas identificou a presença da proteína de interesse.

Diante disso, a partir da concentração das amostras que marcaram a presença da proteína NS1 (Figura 17-A), com o Vivaspín (GE Healthcare – USA) de 5 kDa, foi possível notar, na Figura 17-B, que ocorreu adsorção de NS1. No entanto, observa-se que há a presença de albumina, evidenciando que esta também foi adsorvida nas condições utilizadas com tampão Tris-HCl pH 8,0.

Comparando os resultados obtidos pela técnica Dot-Blot para os 3 ensaios realizados com a amostra A2 de NS1-DENV2 em Tampão Tris-HCl pH 8,0 (Gradiente degrau 35 min, Gradiente linear 30 min e Gradiente degrau 32 min), em coluna aniônica Hitrap QFF, verificou-se que a proteína NS1 apareceu em cerca de 13 amostras das 79 amostras coletadas e adicionadas na membrana de nitrocelulose. Percebeu-se que para estes ensaios, todas as proteínas NS1-DENV2, foram confirmadas na etapa de eluição, destacando que utilizando a coluna Hitrap QFF, foi obtido adsorção significativa da proteína NS1, porém não houve separação das demais proteínas presentes na amostra inicial, como no caso, da presença de albumina, sendo que esta proteína, apareceu em todas as amostras que marcaram a presença de NS1.

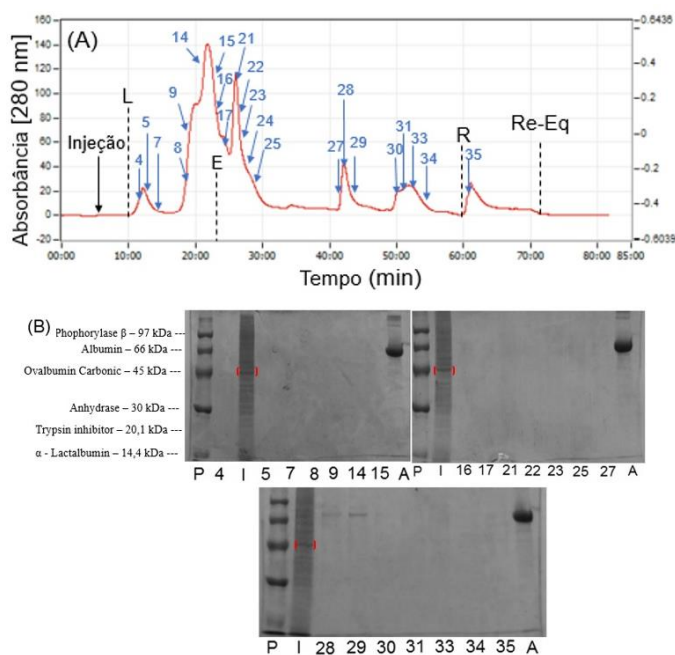
4.3.1.4 Amostra A1 [M50 (1-5)] – NS1 DENV2 – Hitrap QFF – Gradiente Degrau 32 min

Neste ensaio foi utilizado a Amostra A1 [M50 (1-5)] de NS1-DENV2 diluída 2x em tampão Tris-HCl pH 8,0 25 mM, com concentração de 0,35 mg/mL, proveniente dos estudos feitos com Tubo Amicon de 50 kDa, uma vez que, verificou-se a presença de proteína, próxima ao peso molecular da NS1 (45–50 kDa), na eletroforese e no Dot-Blot das amostras que ficaram retidas no filtro de 50 kDa.

Foi utilizado o gradiente degrau de 32 min, com aumento da concentração de NaCl em 4 etapas (começando com 0,15 M de NaCl e finalizando com 1,0 M), a fim de acompanhar a eluição das amostras em cada uma das etapas do gradiente, uma vez que, nos ensaios realizados com este tipo de gradiente para a amostra A2 de NS1-DENV2, não foi possível perceber a presença de NS1, visto que, a amostra A2 não foi concentrada pela etapa com Tubo

Amicon de 30 e 50 kDa. A vazão utilizada foi de 0,8 mL/min. A Figura 18, demonstra o perfil cromatográfico obtido na corrida com gradiente degrau por 32 min e as técnicas analíticas SDS-PAGE e Eletroforese das frações cromatográficas deste ensaio.

Figura 12 - (A) Gradiente degrau 32 min – Amostra A1 [M50 (1-5)] – NS1 DENV2 diluída 2x. Condições de corrida: vazão de 0,8 mL/min, injeção de 1,0 mL da amostra com concentração de 0,35 mg/mL diluída em tampão Tris-HCl pH 8,0 e eluição com tampão de Tris-HCl pH 8,0 + 1M NaCl. (B) SDS-PAGE 10%. Descrição dos poços da eletroforese: Padrão de baixo peso molecular – P, Amostra Inicial – I, Amostras 4 a 16 (Lavagem), 17 a 25 (1ª Etapa gradiente degrau – 0,15 – 0,20 M de NaCl), 27 a 29 (3ª Etapa 0,5 – 1 M de NaCl), 30 a 34 (4ª Etapa – 1M de NaCl), 35 (Regeneração – 1M de NaOH), Proteína de Referência Albumina – A.



É importante ressaltar que este ensaio, foi utilizado o mesmo perfil cromatográfico dos ensaios anteriores com a amostra A2 de NS1-DENV2 em relação ao tempo de cada etapa cromatográfica. Entretanto, foi possível notar na Figura 18-A pelo cromatograma que a etapa de lavagem não havia terminado, pois a maioria das proteínas, que estavam sendo lavadas, não saíram completamente, pois a partir de 22 minutos iniciou-se a etapa de eluição, antes do término da fase anterior. Diante disso, o primeiro pico da fase de eluição possui proteínas que não se ligaram ao suporte de forma eficiente, gerando uma falsa eluição. Nota-se na Figura 18-A que há a maior quantidade de proteínas sendo removidas da coluna na etapa de lavagem, resultando em 2 picos significativos nessa etapa com tampão (tempo entre 10 min e 22 min).

Com isso observa-se que não ocorreu adsorção significativa de proteínas na coluna. Este fato é confirmado a partir do balanço de massa realizado para cada etapa deste ensaio na Tabela 13, onde foi possível perceber que cerca de 54,51% das proteínas presentes na amostra inicial, não foram adsorvidas pela coluna, nas condições utilizadas. Na Figura 18-A, foi possível perceber a formação de 3 picos menores na etapa de gradiente degrau com NaCl (tempo entre 23 min e 54 min) e 1 na etapa de regeneração da coluna NaOH 1M (tempo entre 60 min e 65 min). Esta corrida resultou em 36 amostras coletadas.

Tabela 13 - Balanço de massa por etapa - Gradiente Degrau 32 min – A1 [M50 (1-5)] de NS1-DENV2

Etapa	Massa (mg)	Porcentagem (%)
Injeção	0,35	100,00
Adsorção	0,00	0,00
Lavagem	0,19	54,51
Eluição	0,12	34,85
Regeneração	0,03	8,07
Total	0,34	97,43

Destaca-se uma diferença nesta etapa de lavagem quando comparado ao ensaio (gradiente degrau 32 min) feito com a amostra A2 de NS1-DENV2, uma vez que, houve a formação de um pico característico nesta etapa a partir de 15 min da etapa de lavagem, demonstrando que cerca de 54% do que foi injetado está sendo removido da coluna. Como foi visto nos ensaios com a amostra anterior (A2 de NS1-DENV2), com diferentes gradientes de eluição, a coluna Hitrap QFF apresentou adsorção significativa das proteínas presentes na amostra inicial, porém na eletroforese das amostras iniciais, foi possível observar que a amostra A1 [M50(1-5)], possui outras proteínas além da NS1, quando comparado a amostra A2 de NS1-DENV2, que demonstrou a presença de proteínas como albumina e NS1 em maior quantidade. Sendo assim, a formação de um pico mais significativo na etapa de lavagem, deve-se pela não interação de outras proteínas presentes na amostra injetada na coluna (A1 [M50 (1-5)]).

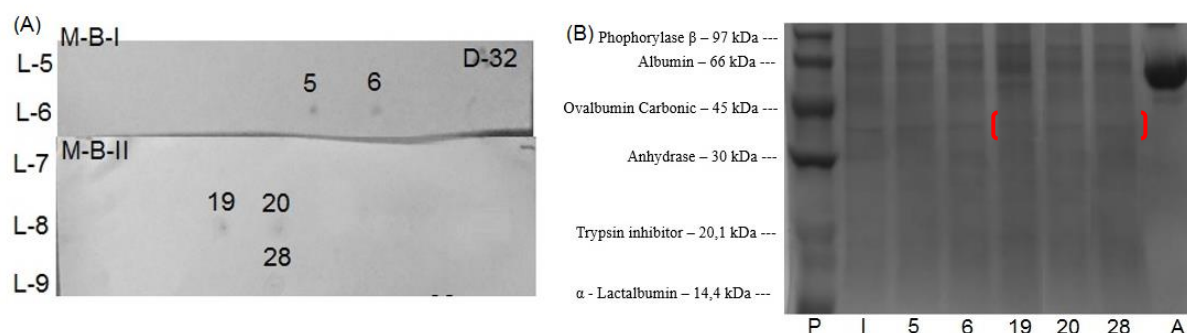
A Figura 18-B é referente aos géis das amostras coletadas no perfil cromatográfico em gradiente degrau 32 min. As amostras injetadas no gel foram escolhidas após o ensaio de Bradford das 36 amostras coletadas em toda corrida, bem como, analisadas através do perfil cromatográfico da corrida no FPLC (Figura 18-A). As amostras (4 a 15) são referentes à fase de lavagem com tampão de adsorção. Nessas amostras não houve o aparecimento de proteínas (Albumina e NS1), devido a possibilidade das amostras estarem diluídas ao final da coleta. As amostras 16 a 25 (Figura 18-B) são referentes a primeira etapa do gradiente degrau, com 0,15

M de NaCl. A amostra 27 é referente ao pico que apareceu na terceira etapa do gradiente com concentração de 0,5 M de NaCl. Contudo, não foi possível perceber o aparecimento de proteínas em nenhuma das amostras injetadas, que ocorreu após as amostras estarem diluídas no final da coleta. Neste gel também não há o aparecimento de uma banda que mostre a NS1.

As amostras 28 e 29 (Figura 18-B) são referentes à terceira etapa do gradiente de grau, com 0,5 M de NaCl. Nota-se nessas amostras o aparecimento de proteínas um pouco acima de 66 kDa (quando comparado ao padrão de proteína de referência adicionada no ultimo poço – Albumina 1 mg/mL). As amostras 30 31, 33 e 34 são referentes a última etapa do gradiente de grau, com 1 M de NaCl. Não houve aparecimento de proteínas nesta etapa do gradiente. A amostra 35 refere-se a etapa de regeneração da coluna com NaOH 1M e também não apresentou bandas de proteínas (Albumina e NS1), tendo em vista a baixa quantidade de proteínas removidas nesta etapa. Em vista do não aparecimento de NS1, pela técnica SDS-PAGE, foi necessário realizar a técnica Dot-Blot, onde na Figura 19-A, de acordo com a membrana utilizada na técnica de Dot Blot (M-B-I e M-B-II),

Figura 13 - (A) Descrição: amostras 5, 6, 19, 20 e 28, indicando a presença de NS1 de acordo com a membrana utilizada na técnica de Dot Blot (M-B-I e M-B-II). (B) SDS-PAGE 10% –

Amostra que marcou NS1. Descrição dos poços da eletroforese: Padrão de baixo peso molecular – P, Amostra Inicial – I, Amostra 5 e 6 (Lavagem), 19 e 20 (1ª Etapa – 0,15 – 0,20 M de NaCl), 28 (3ª Etapa – 0,5 – 1M de NaCl), Proteína de Referência Albumina – A.



Na Figura 19-A foi possível perceber que apareceu a presença de NS1 nas amostras 5 e 6, coletadas na etapa de lavagem. Presença de NS1 nas amostras 19, 20, referente a primeira etapa do gradiente de grau iniciando com 0,15M de NaCl e na amostra 28 coletada na terceira etapa com 0,5M de NaCl.

Na Figura 19-A foi possível verificar que, na etapa de lavagem as amostras 5, 6 com presença de NS1, não foram adsorvidas pela coluna Hitrap QFF. Entretanto, apesar de um pico significativo nesta etapa, a etapa de eluição, confirmou a presença de NS1, nas amostras 19 e 20 e 28 coletadas ao longo da eluição. Sendo assim, destaca-se que a coluna obteve certa

interação pela proteína NS1, uma vez que, foi identificado a presença desta proteína em 3 amostras da etapa de eluição. Todavia, deve-se levar em conta as condições deste ensaio, para melhorar a adsorção da NS1, evitando que esta seja removida na etapa de lavagem, junto as demais proteínas. Na eletroforese (Figura 18-B) das amostras 28 e 29, coletadas na eluição, foi identificado a presença de proteína referente a albumina, na terceira etapa do Gradiente Degrau de eluição, com 0,5 M de NaCl. Contudo, foi possível comprovar pela técnica Dot-Blot, que esta condição também favoreceu a eluição de NS1 da coluna, na amostra 28. Diante disso, a partir da concentração das amostras que marcaram a presença da proteína NS1 (Figura 19-A), foi possível notar, na Figura 19-B, que ocorreu adsorção de NS1 (destacado em vermelho na Figura 19-B), nas amostras 19, 20 e 28. Entretanto, observa-se há a presença de albumina, evidenciando que esta também foi adsorvida nas condições utilizadas com tampão Tris/HCl pH 8,0.

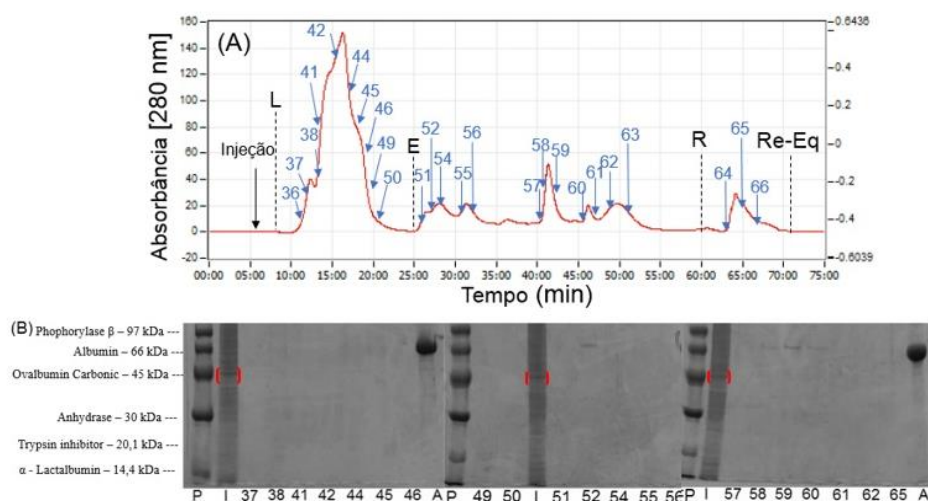
4.3.1.5 Amostra A1 [M50 (1-5)] – Hitrap QFF – Gradiente Degrau 35 min

O segundo ensaio ocorreu nas mesmas condições da corrida anterior (Amostra A1 [M50 (1-5)] - Gradiente Degrau 32 min), alterando o tempo do gradiente degrau para 35 min e com o aumento do tempo da etapa de lavagem, a fim de se obter uma maior eficiência para esta etapa. A vazão utilizada foi de 0,8 mL/min. A Figura 20, demonstra o perfil cromatográfico obtido na corrida com gradiente degrau de 35 min e as técnicas analíticas SDS-PAGE e Dot Blot das frações cromatográficas.

Na Figura 20-A, há 8 picos, sendo 1 na etapa de lavagem com tampão (tempo entre 10 min e 19 min), 6 na etapa de eluição (tempo entre 26 e 52 min) e 1 na etapa de regeneração da coluna com NaOH 1M (tempo entre 63 min e 67 min). Esta corrida resultou em 35 amostras coletadas. Assim como no ensaio anterior, a etapa de lavagem apresentou um pico significativo, indicando que também não ocorreu adsorção significativa de proteínas na coluna. Este fato é confirmado a partir do balanço de massa realizado para cada etapa deste ensaio na Tabela 14, onde foi possível perceber que cerca de 68,06% das proteínas presentes na amostra inicial, não foram adsorvidas pela coluna, nas condições utilizadas.

Na Figura 20-A, há 8 picos, sendo 1 na etapa de lavagem com tampão (tempo entre 10 min e 19 min), 6 na etapa de eluição (tempo entre 26 e 52 min) e 1 na etapa de regeneração da coluna com NaOH 1M (tempo entre 63 min e 67 min).

Figura 20 - (A) Gradiente degrau 35 min – Amostra A1 [M50 (1-5)] – NS1 DENV2 diluída 2x. Condições de corrida: vazão de 0,8 mL/min, injeção de 1,0 mL da amostra com concentração de 0,35 mg/mL diluída em tampão Tris-HCl pH 8,0 e eluição com tampão de Tris-HCl pH 8,0 + 1M NaCl. (B) SDS-PAGE 10%. Descrição: Padrão de baixo peso molecular – P, Amostra Inicial – I, Amostras 37 a 50 (Lavagem), 51 a 54 (1ª Etapa gradiente degrau – 0,10 – 0,15 M de NaCl), 55 e 56 (2ª Etapa 0,15 – 0,20 M de NaCl), 57 a 59 (4ª Etapa – 0,5 – 1 M de NaCl), 60 a 62 (5ª Etapa – 1 M de NaCl), 65 (Regeneração – 1M de NaOH), Proteína de Referência Albumina – A.



Esta corrida resultou em 35 amostras coletadas. Assim como no ensaio anterior, a etapa de lavagem apresentou um pico significativo, indicando que também não ocorreu adsorção significativa de proteínas na coluna. Este fato é confirmado a partir do balanço de massa realizado para cada etapa deste ensaio na Tabela 14, onde foi possível perceber que cerca de 68,06% das proteínas presentes na amostra inicial, não foram adsorvidas pela coluna, nas condições utilizadas.

Tabela 14 - Balanço de massa por etapa - Gradiente Degru 35 min – A1 [M50 (1-5)] de NS1-DENV2

Etapa	Massa (mg)	Porcentagem (%)
Injeção	0,35	100,00
Adsorção	0,00	0,00
Lavagem	0,24	68,06
Eluição	0,08	24,88
Regeneração	0,02	6,01

Total	0,34	98,95
-------	------	-------

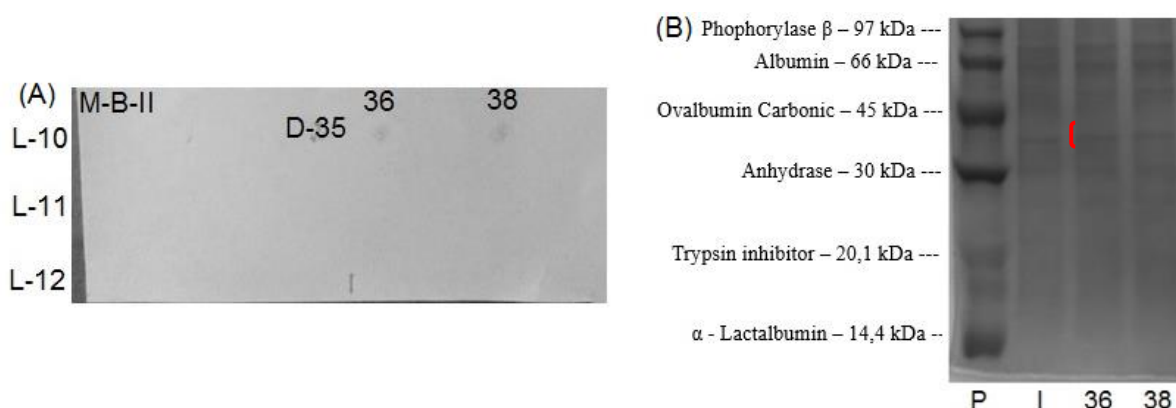
Na Figura 20-A, foi observado que, assim como no primeiro ensaio (Gradiente Degrau 32 min) com a amostra A1 [M50 (1-5)] - NS1 DENV2 diluída 2x, a eluição das proteínas ocorreu sob altas concentrações salinas e não houve distinção quanto ao tipo de gradiente, uma vez que, grande parte das proteínas não foram adsorvidas pela coluna Hitrap QFF, na fase de lavagem.

A Figura 20-B refere-se aos géis das amostras coletadas no perfil cromatográfico (Figura 20-A), no sistema, com a amostra A1 [M50 (1-5)] - NS1 DENV2 em gradiente degrau 35 min. As amostras injetadas no gel foram escolhidas após o ensaio de Bradford das 35 amostras coletadas em toda corrida, bem como, analisadas através do perfil cromatográfico da corrida no FPLC (Figura 20-A). As amostras 37 a 46 (Figura 20-B), são referentes à fase de lavagem com tampão de adsorção. Nessas amostras não houve o aparecimento de proteínas (Albumina e NS1), devido a possibilidade de as amostras estarem bem diluídas, uma vez que, a concentração da amostra inicial é relativamente baixa (0,35 mg/mL).

As amostras 49 a 54 são referentes à primeira etapa do gradiente degrau, com 0,10 M de NaCl. As amostras 55 e 56 são referentes ao pico que apareceu na segunda etapa do gradiente com concentração de 0,2 M de NaCl. A amostra 52, apresenta uma banda leve, um pouco acima de 66 kDa. Todavia, não foi possível perceber o aparecimento de proteínas nas demais amostras injetadas. Neste gel também não há o aparecimento de uma banda que mostre a NS1. As amostras 57, 58 e 59 são referentes a quarta etapa do gradiente degrau, com 0,5 M de NaCl. Nota-se nessas amostras o aparecimento de proteínas um pouco acima de 66 kDa. As amostras 60, 61 e 62 são referentes a última etapa do gradiente degrau, com 1 M de NaCl. Somente na amostra 60, houve o aparecimento de uma banda leve, um pouco acima de 66 kDa. A amostra 65 refere-se a etapa de regeneração da coluna com NaOH 1M e também não apresentou bandas de proteínas (Albumina e NS1), pois apenas 6,01% de proteínas foram removidas da coluna nesta etapa.

Com a técnica Dot-Blot, na Figura 21-A, de acordo com a membrana utilizada na técnica de Dot Blot (M-B-II),

Figura 21 - (A) Descrição: amostras 36 e 38, indicando a presença de NS1 de acordo com a membrana utilizada na técnica de Dot Blot (M-B-II). (B) SDS-PAGE 10% – Amostra que marcou NS1. Descrição: Padrão de baixo peso molecular – P, Amostra Inicial – I, Amostra 36 e 38 (Lavagem), Proteína de Referência Albumina – A.



Na Figura 21-A foi possível perceber que apareceu a presença de NS1 somente nas amostras 36 e 38, coletadas na etapa de lavagem. Isto indica não houve adsorção de NS1 presente na amostra inicial, na coluna Hitrap QFF. O ponto isoelétrico da NS1 é de 5,8, ou seja, em soluções com pH acima deste ponto a proteína estará com cargas negativas. Como a Hitrap QFF é aniônica, esperava-se que ocorresse uma atração maior pela proteína, uma vez que, em pH 8,0 do Tampão Tris/HCl a proteína estaria com cargas a serem atraídas pela coluna. Contudo, algumas das amostras na etapa de eluição estavam diluídas ao final da coleta, este fator pode ter sido determinante para não se observar a presença de um Dot-Blot significativo nas amostras da eluição.

Entretanto, dos 5 ensaios realizados com coluna Hitrap QFF, para amostras A1 [M50 (1-5)] e A2 de NS1-DENV2, este foi o único ensaio que não se observou a presença de NS1, na etapa de eluição. Analisando o perfil cromatográfico da Figura 20-A, não houve adsorção significativa de proteínas, uma vez que, cerca de 68,06% das proteínas injetadas na coluna, não foram adsorvidas nesta etapa. Entre essas proteínas não adsorvidas foi possível identificar a presença da proteína NS1 nas amostras da etapa de Lavagem (Figura 21-B).

Diante desse cenário, optou-se por acompanhar o perfil cromatográfico de adsorção de NS1, utilizando cromatografia de afinidade, com coluna comercial (Hitrap Concanavalina A) e Sistema de leito fixo convencional, com coluna C10/10 empacotada com corante Procion Red MX-5B (PR-MX5B), imobilizado a matrix de quitosana alginato epoxidado (QAE).

Nos 5 ensaios realizados com a coluna Hitrap QFF, não foi identificado proteínas na

etapa de adsorção, devido a baixa concentração das amostras de injeção na coluna e consequentemente, baixa carga de proteína.

4.3.2 Purificação por cromatografia de afinidade

Como a NS1 é uma glicoproteína, assim como anticorpos (UNDERDOWN, 1986; GEISBERGER, LAMERS e ACHATZ, 2006), optou-se por utilizar neste trabalho ensaios de cromatografia de afinidade através de colunas comerciais (Hitrap Concanavalina A – específica para glicoproteínas) e coluna C10/10 empacotada com corante PR-MX5B-QAE, atuando como ligantes pseudobioespecíficos. Estudos que relacionam purificação de NS1 do DENV, na forma recombinante, utilizam colunas de afinidade com metais (AMORIN, *et al.*, 2010 e FALCONAR e YOUNG, 1990).

Como neste trabalho utilizou-se a NS1 nativa do vírus do Dengue sorotipo II, foi utilizado como base de estudos a utilização desses ensaios em colunas de afinidade de modo a verificar o comportamento de adsorção da NS1 em colunas bio e pseudobioespecíficas. Utilizou-se para esses ensaios as amostras liofilizadas A3 e A5 de NS1-DENV2 em colunas de afinidade. Ensaios com a coluna bioespecífica Hitrap Concanavalina A (GE HEALTHCARE, 2017) no sistema FPLC, foi feito com a amostra A3. Os ensaios com a amostra A5 foram feitos em matrix pseudobioespecífica com corante PR-MX5B-QAE, em um sistema de coluna de leito fixo convencional (C10/10).

A amostra A3 após liofilização ficou com uma concentração de 2,2 mg/mL e volume de 300 µL, onde coletou-se 250 µL para os ensaios no sistema FPLC. Esta amostra foi diluída em torno de 5X com tampão Fosfato de Sódio pH 5,9 25 mM, para se obter um volume de no mínimo 1 mL a ser injetado na coluna Hitrap Concanavalina A de 1mL.

A amostra A5 de NS1-DENV2, após a liofilização ficou com um volume de 1,1 mL e concentração de 0,70 mg/mL. Esta amostra foi diluída 2x em tampão Fosfato de Sódio pH 5,9. Este pH de trabalho, utilizado para ambas as amostras, deve-se ao fato que em ensaios com coluna de afinidade, para que haja melhor adsorção da proteína alvo, a amostra de injeção deve estar próxima ao seu ponto isoelétrico (pI), ponto onde as cargas das proteínas são nulas, de modo que a proteína passa a ser adsorvida como molécula específica no ligante da coluna de afinidade. A NS1-DENV2 possui seu ponto isoelétrico de 5,8 (AMORIN, *et al.*, 2010). Na Tabela 15 foi possível verificar a concentração final após a diluição das amostras A3 e A5 de NS1-DENV2.

Tabela 15 - Dados das amostras diluídas de NS1 - DENV2

Amostra	Vi (mL)	Fator de Diluição	Vf (mL)	Ci (mg/mL)	Cf (mg/mL)
A3	0,250	5x	1,3	2,20	0,44
A5	1,1	2x	2,2	0,70	0,35

Vi – Volume Inicial da amostra

Vf – Volume final da amostra após a diluição com tampão

Ci – Concentração Inicial da amostra

Vf – Concentração final da amostra após a diluição com tampão

Na etapa de eluição foi adicionado 1 M de NaCl no tampão de adsorção (Fosfato de Sódio pH 5,9 25 mM) e nos ensaios foram utilizados dois tipos de gradientes, Linear (No sistema FPLC com a coluna Hitrap Concanavalina A) e isocrático (No sistema de leito fixo em coluna C10/10). Nestes ensaios foram injetados 1 mL da amostra, com vazão de 0,8 mL/min. Foi analisada uma corrida no sistema FPLC com coluna de Concanavalina A, pois havia somente 1 mL a ser injetado da amostra (A3-NS1-DENV2). Nas corridas com a matriz pseudobioespecífica, PR-MX5B-QAE foram feitas duas corridas cromatográficas.

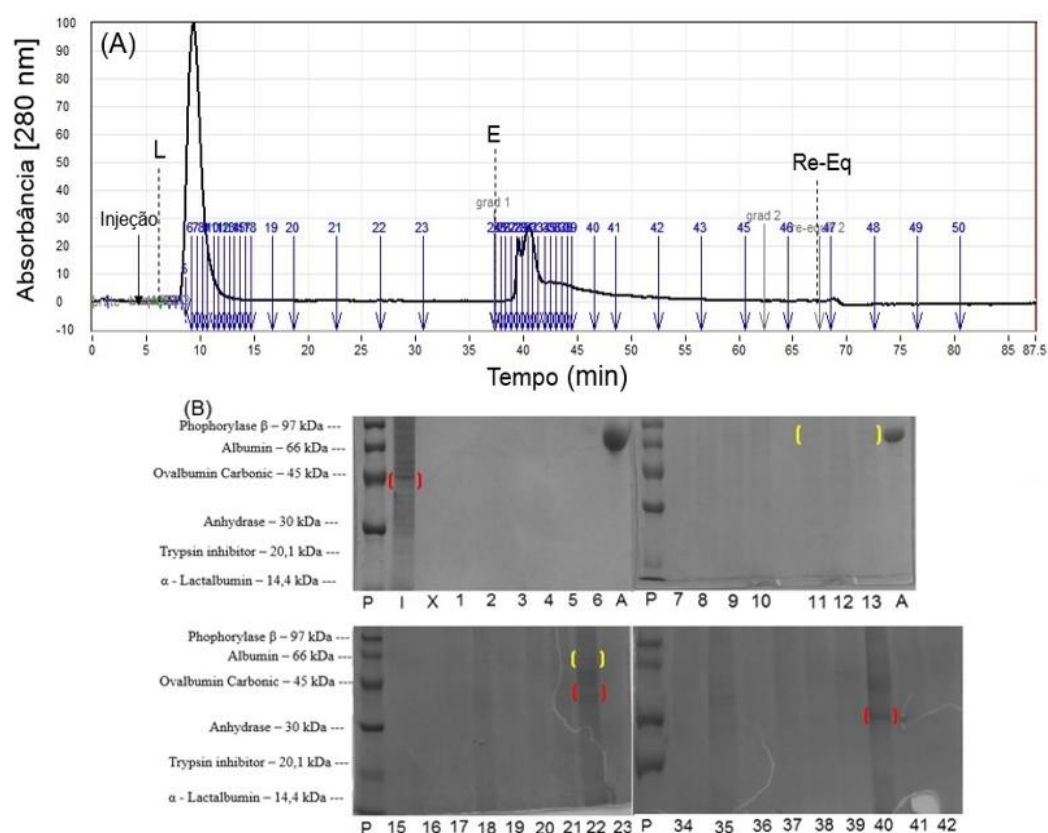
4.3.2.1 Amostra A3 – NS1 DENV2 – Hitrap Concanavalina A – Gradiente Linear 30 min – Sistema FPLC - Contichrom

Nesta corrida, utilizou-se o sistema FPLC – Contichrom e procurou-se trabalhar com 25 min na etapa de gradiente linear de 0 - 1M, sendo seguida de 5 min a mais na concentração maior de NaCl 1M, a fim de verificar a total remoção de proteínas nesta etapa. A etapa de lavagem após a injeção de 1 mL foi cerca de 30 min, pois como só havia 1 mL disponível da amostra A3 para este ensaio, foi necessário aumentar cada etapa cromatográfica, a fim de acompanhar todo o perfil cromatográfico em suas diferentes etapas.

A Figura 22 demonstra o perfil cromatográfico obtido na corrida com gradiente linear por 30 min, utilizando a amostra A3 de NS1-DENV2.

Foram coletadas amostras de 30 em 30 segundos, a partir do aparecimento do pico nas diferentes fases da adsorção e a partir de 15 min foi mantido o intervalo de 2 min entre as coletas nesta etapa de lavagem, a fim de acompanhar todo o perfil cromatográfico ao longo do tempo (Figura 22-A), uma vez que, o volume de amostra para injeção era de somente 1 mL.

Figura 14 – (A) Gradiente Linear 30 min – Amostra A3 – NS1 DENV2 diluída 5x. Condições de corrida: vazão de 0,8 mL/min, injeção de 1,0 mL da amostra com concentração de 0,44 mg/mL diluída em tampão Fosfato pH 5,9 25 mM e eluição com tampão de Tris-HCl pH 8,0 + 1M NaCl. (B) SDS-PAGE 10% – Gradiente Linear 30 min – Concentração de 0,44 mg/mL. Descrição dos poços da eletroforese: Padrão de baixo peso molecular – P, Amostra Inicial – I, Amostras 1 a 12 (1º Pico - Lavagem), 15 a 23 (Lavagem, após 13:40 min), 34 a 38 (Pico – Eluição), 39 a 42 (Eluição, após 44:30 min), Proteína de Referência Albumina – A.



Foram coletadas amostras de 30 em 30 segundos, a partir do aparecimento do pico nas diferentes fases da adsorção e a partir de 15 min foi mantido o intervalo de 2 min entre as coletas nesta etapa de lavagem, a fim de acompanhar todo o perfil cromatográfico ao longo do tempo (Figura 22-A), uma vez que, o volume de amostra para injeção era de somente 1 mL. Neste ensaio houve um aparecimento de um pico significativo na etapa de lavagem, indicando que a maioria das proteínas presentes na amostra inicial, não foram adsorvidas na coluna. Este fato é confirmado a partir do balanço de massa realizado para cada etapa deste ensaio na Tabela 16, onde foi possível perceber que cerca de 71,50% das proteínas presentes na amostra inicial, não foram adsorvidas pela coluna, nas condições utilizadas.

Tabela 16 - Balanço de massa por etapa - Gradiente Linear 30 min – A3 de NS1-DENV2

Etapa	Massa (mg)	Porcentagem (%)
Injeção	0,44	100,00
Adsorção	0,00	0,00
Lavagem	0,31	71,50
Eluição	0,13	28,50
Re-Equilíbrio	0,00	0,00
Total	0,44	100,00

Enquanto aos 38 min da etapa de eluição começou a se formar um pico significativo, representando 28,50% das proteínas que foram eluídas da coluna. Ambos os picos foram coletados, também a cada 30 segundos em diferentes eppendorfs. Esta corrida resultou em 50 amostras coletadas. Na Tabela 16, foi possível perceber que não houve o aparecimento de proteínas na etapa de Re-equilíbrio, uma vez que, as proteínas que foram adsorvidas na coluna na etapa de lavagem, foram removidas na etapa de eluição.

A Figura 22-B é referente aos géis das amostras coletadas na corrida com a amostra A3 diluída 5x em gradiente linear 30 min. As amostras injetadas no gel foram escolhidas após a quantificação por Bradford das 50 amostras coletadas em toda corrida, bem como, analisadas através do perfil cromatográfico da corrida no FPLC. As amostras 1 a 12 são referentes a etapa de lavagem com tampão, porém somente houve o aparecimento de albumina, quando comparado ao poço com a amostra padrão de referência de albumina (A), com concentração de 1mg/mL (destacado em amarelo na Figura 22-B), nas amostras 11, 12 e 13. Estas amostras foram coletadas no pico significativo que apareceu na etapa de lavagem. As amostras 16 até a 23 são referentes as coletas feitas no intervalo de 2 min a partir do tempo de 15 min de corrida. Verificou-se que nesta etapa houve o aparecimento de proteínas na amostra 22, dando evidencia da presença de NS1 (destacado em vermelho Figura 22-B – amostra 22) e Albumina (destacado em amarelo na Figura 22-B - amostra 22).

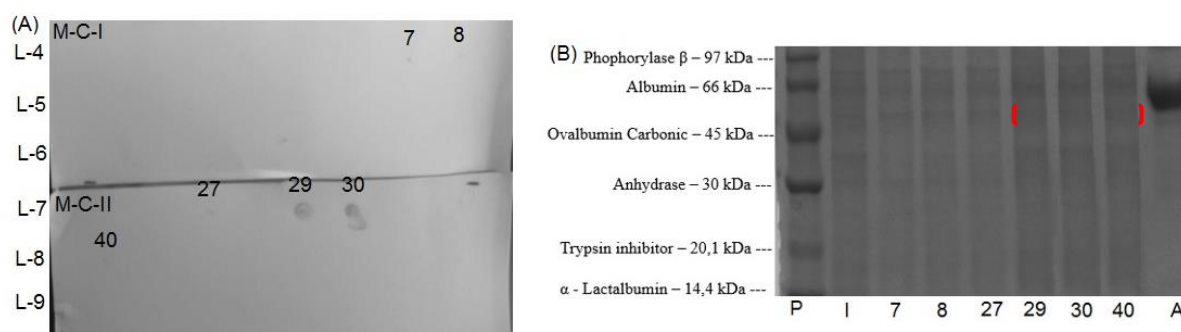
Amostras da fase de eluição (34 até 42), cujo o tempo foi de 42 min até 56 min da corrida em que a concentração de NaCl varia de 0,2M até 1M de sal. Foi possível perceber uma banda fraca de proteína na amostra 40 (destacado em vermelho na amostra 40, na Figura 22-B) próxima ao padrão de 45 kDa, que faz referência ao peso molecular da NS1. Esta amostra 40 foi coletada após o aparecimento do pico no intervalo de 2 min entre as coletas e com isto a amostra pode ter ficado diluída.

Conforme a Figura 22-A, analisando as eletroforeses da etapa de lavagem (Figura 22-

Neste ensaio realizado com a amostra A3 de NS1-DENV2 diluída 5x em Tampão Fosfato de Sódio pH 5,9, na coluna Coluna Hitrap Concanavalina A, com Gradiente Linear 30 min, foi possível perceber a presença de uma banda de proteína referente a NS1, na amostra 22 e 40, sendo a amostra 22, coletada no intervalo de 2 em 2 minutos, na etapa de lavagem, após o aparecimento do pico nesta etapa (Figura 22-A). A amostra 40 foi coletada no pico formado na etapa de eluição (Figura 22-A), após 40 minutos de corrida. Após este tempo de coleta a concentração de NaCl era em torno de 0,2M, destacando que cerca de 28,50% do que foi adsorvido pela coluna, pode ser removido com baixa concentração de sal (NaCl).

A Figura 23 refere-se a técnica Dot-Blot e Eletroforese das amostras que marcaram a presença da proteína NS1.

Figura 15 - (A) Descrição: amostras 7, 8, 27, 29, 30 e 40, indicando as proteínas que marcaram a presença de NS1 de acordo com a membrana utilizada na técnica de Dot Blot (M-C-I e M-C-II). (B) SDS-PAGE 10% – Amostra que marcou NS1. Descrição: Padrão de baixo peso molecular – P, Amostra Inicial – I, Amostra 7 e 8 (Pico - Lavagem), 27 a 30 (Pico – Eluição), 40 (Eluição, após 48:30 min), Proteína de Referência Albumina – A.



Na Figura 23-A percebeu-se que, na etapa de lavagem as amostras 7 e 8 com presença de NS1, não foram adsorvidas pela coluna Hitrap QFF. Todavia, observou-se que a

concentração desta proteína não adsorvida é baixa, pois os Dot-Blots dessas amostras marcaram levemente na membrana. As amostras 27, 29 e 30 marcaram a presença de NS1 no pico da eluição (Pico 2), com isso, observou-se que a coluna obteve certa afinidade pela proteína NS1, uma vez que, foi identificado a presença desta proteína em 3 amostras da etapa de eluição, com destaque na concentração obtida nos pontos blot da amostra 29 e 30, destacando uma quantidade significativa de NS1, eluídas da coluna nesta etapa. A amostra 40, foi coletada no intervalo de 2 min, após o aparecimento do pico. Entretanto, assim como na eletroforese desta amostra (Figura 22-B), na técnica de Dot-Blot (DB), foi possível comprovar a presença de NS1 nesta amostra, porém com concentração baixa, uma vez que, o Dot Blot marcou levemente na membrana (M-C-II, Linha 8).

Diante disso, a partir da concentração das amostras que marcaram a presença da proteína NS1 (Figura 23-A), foi possível notar, na Figura 23-B, que ocorreu adsorção de NS1 (destacado em vermelho na Figura 23-B), nas amostras 27, 29, 30 e 40, que apresentaram a presença da proteína de interesse e quando comparado a amostra inicial (A3), foi possível perceber que neste ensaio foi possível obter a proteína NS1 em maior concentração, com remoção parcial das proteínas presentes na amostra A3 de NS1-DENV2. Destaca-se que, em cerca de 28,50% de proteínas eluídas da coluna Hitrap Concanavalina A, foram coletadas 15 amostras neste pico e dessas somente 3 marcaram a presença significativa de NS1. Esperava-se adsorção significativa desta proteína, pois esta coluna tem afinidade específica com glicoproteínas, como é o caso da proteína NS1-DENV2.

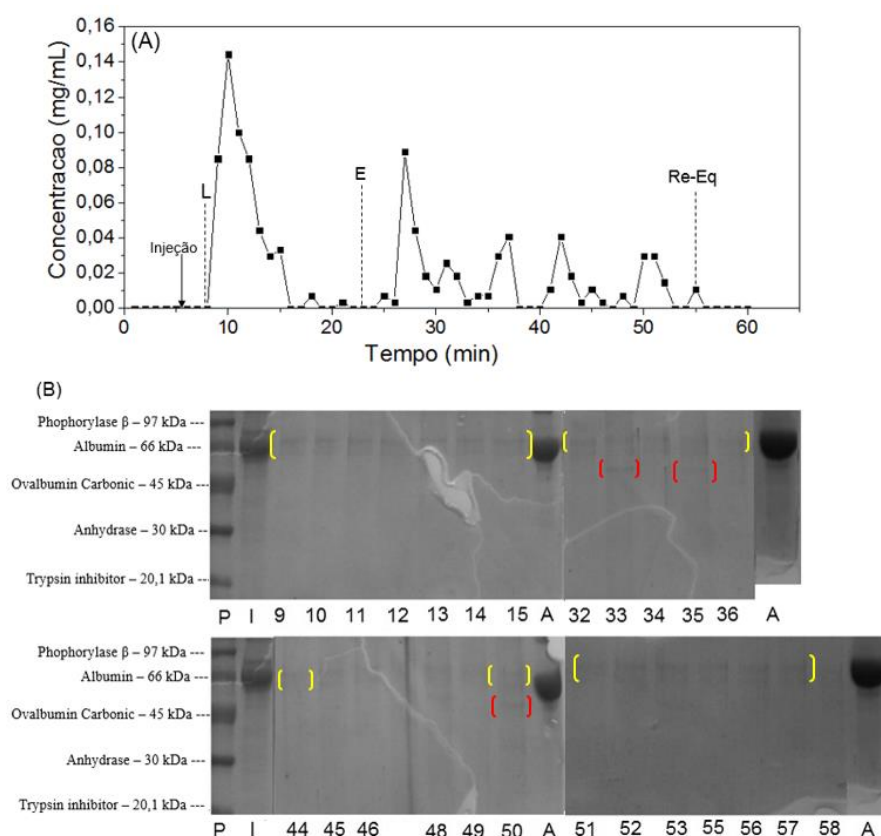
4.3.2.2 Amostra A5 – NS1 DENV2 – Procion Red MX-5B – Eluição Isocrática 30 min – Coluna C10/10 – Sistema de leito fixo convencional – Primeiro ensaio

Utilizou-se para os ensaios em coluna de leito fixo convencional (C10/10 empacotada com corante PR-MX5B-QAE) 2 mL da amostra A5 de NS1-DENV2 diluída 2x com tampão Fosfato de Sódio pH 5,9 25 mM. Optou-se por utilizar este sistema, uma vez que, o volume ideal de trabalho em sistemas como o FPLC é de no mínimo 5 mL para que seja feita o bombeamento das amostras nas colunas pelas tubulações. A amostra A3 possuía volume de 1,3 mL após a diluição com o tampão e no momento da corrida, tornou-se muito difícil a etapa de injeção da amostra, uma vez que, havia a possibilidade de entrada de ar no sistema e este comprometer a coluna e o equipamento. Diante deste cenário optou-se por utilizar a amostra A5 com o sistema convencional em leito fixo, com bomba peristáltica e coletor manual, uma vez que, a tubulação era menor da injeção até a coluna.

Em contrapartida a facilidade de operação com este sistema, somente foi possível

operar com etapa de eluição isocrática, ou seja, etapa em que a concentração do sal é constante ao longo desta etapa. Com isso, procurou-se trabalhar com 30 min na eluição isocrática com 1M de NaCl acrescidos ao tampão de adsorção (Fosfato de Sódio pH 5,9 25 mM). A etapa de lavagem após a injeção de 1 mL foi cerca de 15 min, a vazão utilizada foi de 1 mL/min. A Figura 24, demonstra o perfil cromatográfico obtido na corrida eluição isocrática de 30 min, utilizando a amostra A5 de NS1-DENV2. Essas condições foram utilizadas nos dois ensaios com a amostra A5 de NS1-DENV2 diluída 2x, com concentração de 0,35 mg/mL, a fim de acompanhar o comportamento cromatográfico utilizando corantes pseudobioespecíficos (PR-MX-5B-QAE) para adsorção de NS1-DENV2.

Figura 16 – (A) Amostra A5 de NS1-DENV2 diluída 2x – 1º Ensaio – Corante Procion Red MX-5B – Eluição isocrática 30 min - vazão de 1 mL/min, injeção de 1,0 mL da amostra com concentração de 0,35 mg/mL diluída em tampão Fosfato de Sódio pH 5,9 e eluição com tampão Fosfato de Sódio pH 5,9 + 1M de NaCl. (B) SDS-PAGE 10% – Eluição isocrática 30 min – Concentração de 0,35 mg/mL. Descrição dos poços da eletroforese: Padrão de baixo peso molecular – P, Amostra Inicial – I (A5 de NS1-DENV2), Amostras 9 a 15 (Lavagem), 32 a 36 (Eluição – 32-36 min), 44 a 50 (Eluição – 44-50 min), 51 a 53 (Final Eluição – 51-53 min), 56 a 58 (Re-Equilíbrio), Proteína de Referência Albumina – A.



Neste ensaio (Figura 24-A) houve um aparecimento de um pico significativo de maior intensidade na etapa de lavagem. Destaca-se que a partir de 30 min da corrida, houve somente a formação de 5 picos na etapa de eluição. Este fato deve-se que a maioria das proteínas que foram adsorvidas na coluna, apareceram na etapa de eluição, conforme pode ser visto na Tabela 17, onde praticamente todas proteínas adsorvidas saíram na eluição, que através do balanço de massa, foram removidas 46,25% das proteínas adsorvidas na coluna para esta etapa.

Tabela 17 - Balanço de massa por etapa – Eluição Isocrática 30 min – A5 de NS1-DENV2 – 1º Ensaio

Etapa	Massa (mg)	Porcentagem (%)
Injeção	0,405	100,00
Adsorção	0,000	0,00
Lavagem	0,205	50,62
Eluição	0,187	46,25
Re-Equilíbrio	0,002	0,49
Total	0,394	97,36

Analizando a eletroforese das amostras (Figura 24-B), gráfico obtido (Figura 24-A) e o balanço de massa (Tabela 17), foi possível perceber um pico significativo na etapa de lavagem (Figura 24-A - Amostras 10 a 16). Comprova-se pelo aparecimento de maior quantidade de albumina, destacado em amarelo na Figura 24-B (comparado com o padrão de referência Albumina – A – peso molecular 66 kDa), ou seja, nesta condição grande parte da Albumina presente na amostra inicial não é adsorvida, uma vez que, o pI (ponto isoelétrico) da albumina é de 4,7, ou seja, não esta sendo favorável a adsorção desta proteína nesta fase. Também destaca-se a possibilidade da NS1 presente na amostra inicial estar sendo adsorvida pela matriz de pseudobioafinidade.

Nas amostras coletadas a partir de 32 min na etapa de eluição com 1M de NaCl, foi possível perceber que somente nas amostras 33 e 35 aparece uma banda leve de albumina (destacado em amarelo na Figura 24-B), seguida por uma banda leve de proteína com peso molecular próximo ao da NS1 (45–50 kDa) destacado em vermelho na Figura 24-B.

Neste ensaio, foi possível perceber bandas mais leves de albumina, a partir de 44 min, referente ao quarto pico da etapa de eluição. Com isso foi possível destacar que boa parte da albumina presente na amostra inicial, não foi adsorvida pela matriz de pseudobioafinidade, nas condições utilizadas e com isso pouca quantidade desta proteína é perceptível na eluição. foi possível perceber bandas leves de Albumina (destacado em amarelo), nas amostras 55, 56 e 57 da etapa de Re-equilíbrio com o próprio tampão de

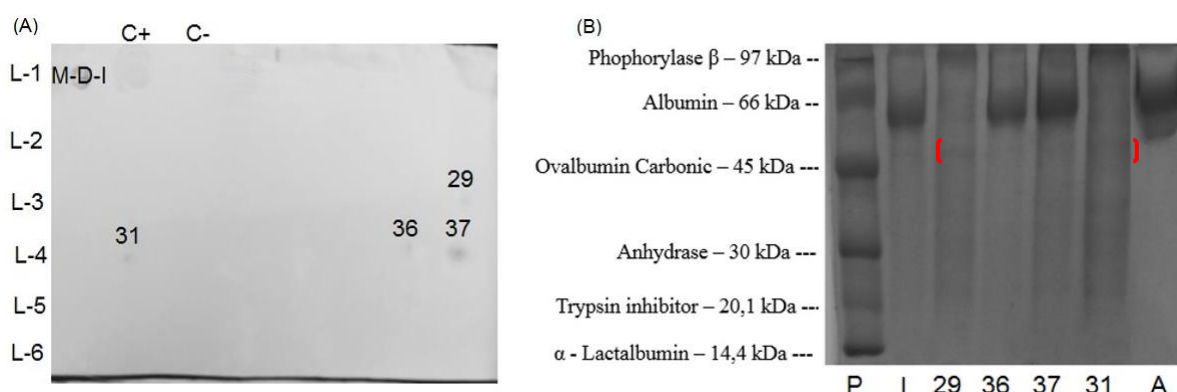
adsorção (Fosfato de Sódio pH 5,9), evidenciando que parte dessas proteínas que ainda estavam retidas na coluna, foram removidas nesta etapa.

Tais resultados demonstram também que o adsorvente possui pouca afinidade com a albumina presente na amostra e identificou uma afinidade relativa com a proteína NS1, tendo em vista que, segundo Gondim *et al.* (2012), corantes pseudobioespecíficos ligados a matrix de QAE, como o corante Cibacron (QAE-Cib) apresentam potencial para ser utilizado na purificação de IgG humana sob condições otimizadas. No caso do estudo deste trabalho, como a proteína alvo (NS1), trata-se de uma glicoproteína, assim como a IgG, o corante PR-MX5B-QAE, demonstrou afinidade relativa com a proteína NS1. Ainda em estudos de Santos, et al., (2016), os autores investigaram o potencial do corante PR-MX5B-QAE como ligante bioespecífico para purificação de IgG em amostras do soro humano. Neste estudo, os autores observaram com ensaios em leito fixo com amostra de soro humano uma maior adsorção de IgG, considerando o corante PR-MX5B-QAE como um ligante bioespecífico de média afinidade para com IgG, com remoção parcial de albumina presente no soro humano.

Foi realizado a técnica Dot-Blot para se confirmar a real presença desta proteína, nas frações obtidas na eluição para as amostras 33, 35 e 50 ambas coletadas na etapa de eluição.

Na Figura 25 foi possível verificar as amostras que marcaram a presença de NS1 pela técnica Dot-Blot com membrana M-D-I e a eletroforese dessas amostras.

Figura 17 - (A) Descrição dos Dot-Blots visíveis na Membrana M-D-I, Letras: (C+) Controle Positivo – Presença de NS1 Recombinante; (C-) Controle Negativo – Sobrenadante L-15 sem a presença de NS1, Amostras 1º Ensaio com Corante PR-MX5B-QAE – Eluição isocrática 30 min - Amostras que marcaram NS1: Amostras 29 a 36 referentes a etapa de eluição isocrática coletadas a parti de 29 min. (B) SDS-PAGE 10% – Eluição isocrática 30 min – Concentração de 0,35 mg/mL. Descrição dos poços da eletroforese: Padrão de baixo peso molecular – P, Amostra Inicial – I (A5 de NS1-DENV2), Amostras 29 a 31 (Eluição – 29-31 min), 36 e 37 (Eluição – 36-37 min), Proteína de Referência Albumina – A.



Na Figura 25-A percebeu-se que, na etapa de eluição isocrática, a partir de 29 min de ensaio cromatográfico, as amostras 29, 31, 36 e 37 marcaram a presença de NS1. Não foi possível verificar a presença de NS1 em nenhuma outra amostra injetada até o final a Linha 6 (L-6) desta membrana. Com isso, pode-se destacar que o Corante PR-MX5B-QAE obteve certa afinidade pela proteína NS1, uma vez que, foi identificado a presença desta proteína em 4 amostras da etapa de eluição, com destaque na concentração obtida nos Dot-Blots da amostra 36 e 37, destacando uma quantidade significativa de NS1, eluídas do corante nesta etapa.

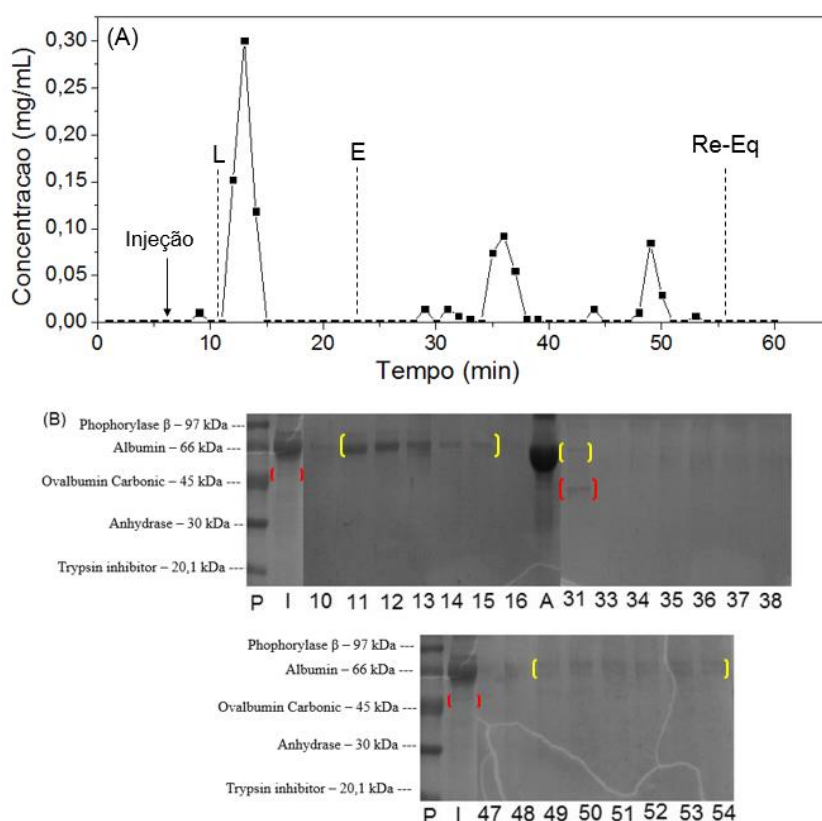
Diante disso, a partir da concentração das amostras que marcaram a presença da proteína NS1, foi possível notar, na Figura 25-B, que ocorreu adsorção de NS1 (destacado em vermelho na Figura 25-B), nas amostras 29, 31, 36 e 37. Sendo assim, quando comparado a amostra inicial (A5), foi possível perceber que neste ensaio foi possível obter a proteína NS1 em maior concentração, com remoção parcial das proteínas presentes na amostra de injeção.

4.3.2.3 Amostra A5 – NS1 DENV2 –Procion Red MX-5B – Eluição Isocrática 30 min – Coluna C10/10 – Sistema de leito fixo convencional – Segundo Ensaio

Neste segundo ensaio, utilizaram-se as mesmas condições do primeiro, a fim de comparar se o comportamento de adsorção neste tipo de ligante pseudobioespecífico permaneceria o mesmo. O comparativo se faz necessário a fim de identificar nas diferentes fases cromatográficas quais proteínas estariam sendo adsorvidas e eluídas sobre as mesmas condições. Portanto, neste segundo ensaio foi utilizado a mesma coluna do ensaio anterior, com o volume de injeção de 1 mL.

A partir da ideia de comparar as corridas cromatográficas, procurou-se trabalhar com 30 min na eluição isocrática com 1M de NaCl. A etapa de lavagem após a injeção de 1 mL foi cerca de 15 min, a vazão utilizada foi de 1 mL/min. A Figura 26, demonstra o perfil cromatográfico obtido na corrida, utilizando a amostra A5 de NS1-DENV2 diluída 2x, com concentração de 0,35 mg/mL, a fim de acompanhar o comportamento cromatográfico utilizando corantes pseudobioespecíficos (PR-MX-5B-QAE) para adsorção de NS1-DENV2.

Figura 18 - (A) Amostra A5 de NS1-DENV2 diluída 2x – 2º Ensaio – Corante Procion Red MX-5B – Eluição isocrática 30 min - vazão de 1 mL/min, injeção de 1,0 mL da amostra com concentração de 0,35 mg/mL diluída em tampão Fosfato de Sódio pH 5,9 e eluição com tampão Fosfato de Sódio pH 5,9 + 1M de NaCl. (B) SDS-PAGE 10% – Eluição isocrática 30 min – Concentração de 0,35 mg/mL. Descrição dos poços da eletroforese: Padrão de baixo peso molecular – P, Amostra Inicial – I (A5 de NS1-DENV2), Amostras 10 a 16 (Lavagem), 32 a 38 (Eluição – 32-38 min), 47 a 54 (Final - Eluição – 47-54 min), Proteína de Referência Albumina – A.



Quando comparado os ensaios cromatográficos (1º e 2º ensaio), neste segundo houve um aparecimento de um pico significativo de maior intensidade, que o primeiro ensaio, na etapa de lavagem. Destaca-se que a partir de 30 min da corrida, houve somente a formação de 2 picos na etapa de eluição somente. Nesta corrida não houve formação de pico na etapa de Re-equilíbrio com o próprio tampão de adsorção (Fosfato de Sódio pH 5,9). Este fato deve-se que a maioria das proteínas retidas na coluna, foram removidas na etapa de eluição, conforme pode ser visto na Tabela 18, onde praticamente todas proteínas adsorvidas saíram na eluição

(41,85%).

Tabela 18 - Balanço de massa por etapa – Eluição Isocrática 30 min – A5 de NS1-DENV2 – 2º Ensaio

Etapa	Massa (mg)	Porcentagem (%)
Injeção	0,405	100,00
Adsorção	0,000	0,00
Lavagem	0,227	55,93
Eluição	0,170	41,85
Re-Equilíbrio	0,000	0,00
Total	0,401	97,78

Analizando a eletroforese das amostras (Figura 26-B), o gráfico obtido (Figura 26-A) e o balanço de massa (Tabela 18) foi possível perceber a diferença na intensidade dos picos, para a etapa de lavagem com tampão Fosfato de Sódio pH 5,9 25 mM (Figura 26-B – Amostras 10 a 16), quando comparamos com o 1º ensaio, onde obteve-se um pico de concentração 0,14 mg/mL. No pico do 2º Ensaio (Figura 26-B), este apresentou uma concentração de 0,30 mg/mL aproximadamente 2x maior do que o ensaio anterior. Isto comprava-se pelo aparecimento de maior quantidade de albumina, destacado em amarelo na Figura 26-B, ou seja, nesta condição grande parte da Albumina presente na amostra inicial não foi adsorvida, nas condições utilizadas. Neste contexto, também destaca-se a possibilidade da NS1 presente na amostra inicial estar sendo adsorvida pelo corante.

Outro ponto a destacar, refere-se ao não aparecimento de proteínas na etapa de Re-equilíbrio (Tabela 18), uma vez que, as proteínas que haviam sido adsorvidas pela coluna, foram removidas na etapa de eluição. Essa é uma das vantagens em se trabalhar com fases estacionárias sintetizadas (PR-MX5B-QAE) neste estudo, pois se exige condições mais amenas para eluição de proteínas, quando comparado a utilização de colunas de afinidade bioespecíficas e dessa maneira diminui as chances de causar danos na proteína dessorvida.

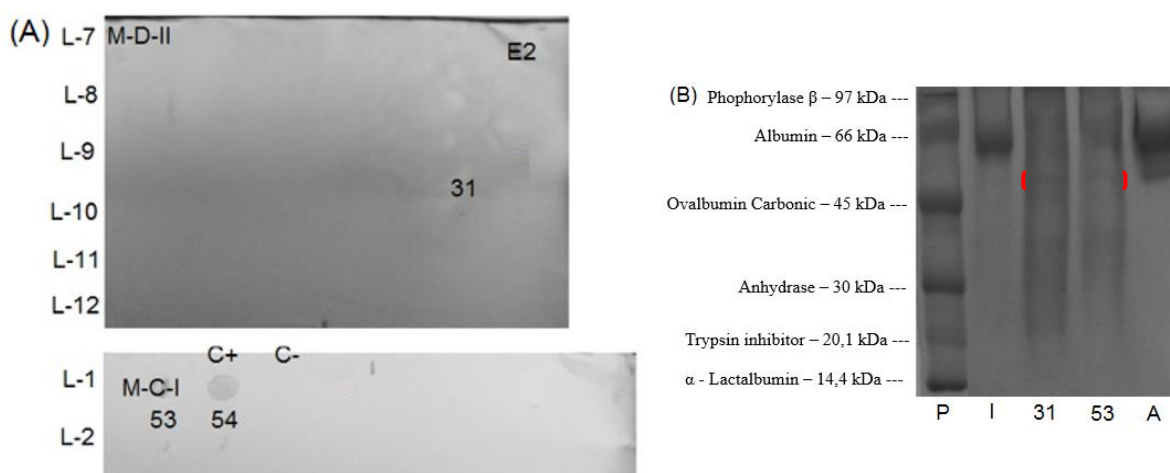
Nas amostras coletadas com a partir de 31 min na etapa de eluição com 1M de NaCl, foi possível perceber que somente na amostra 31 aparece uma banda leve de albumina (destacado em amarelo na Figura 26-B), seguida por uma banda leve de proteína com peso molecular próximo ao da NS1 (45–50 kDa) destacado em vermelho na Figura 26-B.

Neste ensaio foi possível perceber bandas mais leves de albumina, a partir de 48 min, referente ao segundo pico da etapa de eluição. Com isso foi possível destacar que boa parte da albumina presente na amostra inicial, não foi adsorvida pelo corante PR-MX5B-QAE, nestas condições, na etapa de lavagem e com isso pouca quantidade desta proteína é perceptível na

eluição. Tais resultados demonstram também que o adsorvente corante PR-MX5B-QAE possui pouca afinidade com a albumina presente na amostra e identificou uma afinidade relativa com a proteína NS1. Entretanto, foi necessário verificar a real presença desta proteína, nas frações obtidas na eluição através da técnica Dot-Blot (Figura 27-A).

Na Figura 27 foi possível verificar as amostras que marcaram a presença de NS1 pela técnica Dot-Blot com membrana M-D-II, M-C-I e a eletroforese dessas amostras. Na segunda metade da quarta membrana (M-D-II), foram adicionadas em ordem as amostras restantes do primeiro ensaio (amostra 53 até 60) e as amostras de 1 à 48 do segundo ensaio com este corante. Neste caso o controle positivo (C+) e negativo (C-) utilizado na membrana (M-D-I) é o mesmo da membrana (M-D-II), uma vez que, ambas reference a mesma membrana (M-D), dividida na metade. No começo da terceira membrana (M-C-I), também foram adicionados amostra do 2º Ensaio com corante PR-MX5B-QAE (Linha 1 e Linha 2).

Figura 19 - (A) Descrição dos Dot-Blots visíveis na Membrana M-D-II, Letras: (E2) – Amostras do 2º Ensaio com Corante PR-MX5B-QAE – Eluição isocrática 30 min - que marcaram NS1: Amostras 31, 53, 54 referentes a etapa de eluição isocrática coletadas a parti de 31 min. (B) SDS-PAGE 10% – Eluição isocrática 30 min – Concentração de 0,35 mg/mL. Descrição dos poços da eletroforese: Padrão de baixo peso molecular – P, Amostra Inicial – I (A5 de NS1-DENV2), Amostras 31 (Eluição – após 31 min), 53 (Eluição – após 53 min), Proteína de Referência Albumina – A.



Na Figura 27-A percebeu-se que, na etapa de eluição isocrática, a partir de 31 min de ensaio cromatográfico, as amostras 31, 53 e 54 marcaram a presença de NS1. Entretanto, nota-se que essas amostras marcaram levemente a proteína de interesse, no Dot-Blot, tendo em vista a baixa concentração desta proteína nesta amostra. Com isso, pode-se destacar que o adsorvente obteve certa afinidade pela proteína NS1, uma vez que, foi identificado a presença

desta proteína em 3 amostras da etapa de eluição. A partir da análise a eletroforese das amostras coletadas ao longo do perfil cromatográfico (Figura 26-B), que somente a amostra 31, apresentou uma banda de proteína próxima à da NS1 (45-50 kDa). Com isso, através da técnica Dot-Blot (Figura 3) foi possível verificar a real presença desta proteína nesta amostra.

Diante disso, a partir da concentração das amostras que marcaram a presença da proteína NS1, foi possível notar, na Figura 27-B, que ocorreu adsorção de NS1 (destacado em vermelho na Figura 27-B), nas amostras 31 e 53. Neste caso, quando comparado a amostra inicial (A5), foi possível perceber que neste ensaio foi possível obter a proteína NS1 em maior concentração, com remoção parcial das proteínas presentes na amostra de injeção.

Assim como, nos ensaios com troca iônica, os ensaios com a coluna Hitrap Concanavalina A e corante PR-MX5B-QAE, não foi identificado a presença de proteínas na etapa de adsorção (loading), uma vez que a carga inicial de proteínas era baixa, devido a baixa concentração das amostras de injeção (média de concentração das amostras de injeção na coluna de 0,4 mg/mL).

5 CONCLUSÃO

Neste trabalho, foi possível realizar a produção da proteína não estrutural NS1 nativa do vírus do Dengue sorotipo II (NS-DENV2), o qual resultou em amostras com concentrações diferentes, sendo necessário etapas de concentração da mesma, de modo que a etapa de liofilização obteve maior concentração das amostras.

A técnica de concentração utilizando a separação por peso molecular com Tubo Amicon 30 e 50 kDa se mostrou eficiente, quanto ao aumento da concentração da amostra. Contudo observou-se que não há uma separação total da NS1 para as demais proteínas presentes na amostra bruta. Tanto nas centrifugações com a amostra A1, quanto na amostra A2, foi possível identificar a presença de outras proteínas nas diferentes centrifugações. Outro fator a destacar, foi que as amostras que apresentaram maiores concentrações, obtiveram volumes baixos para se trabalhar em sistemas cromatográficos.

Em relação aos ensaios realizados foi possível perceber um melhor perfil de adsorção da NS1, através do uso de colunas de afinidade. Isto deve-se ao fato que estas se ligam especificamente com a proteína de interesse (proteína-alvo), tendo em vista que, os ensaios realizados com a coluna Hitrap Concanvalina A e com o corante PR-MX5B-QAE, apresentaram uma maior retenção da NS1, com remoção parcial de proteínas presentes na amostra inicial (A3 e A5 de NS1-DENV2). Diante disso, foi possível destacar a utilização da matriz de pseudobioafinidade (PR-MX5B-QAE) para retenção da proteína não estrutural NS1, objetivando obter uma maior concentração desta proteína, pois conforme observado na eletroforese das amostras que marcaram a presença desta proteína pela técnica DB, na etapa de eluição, foi possível identificar, que houve adsorção desta proteína nas condições utilizadas

Estudos realizados com cromatografia de troca iônica, para adsorção desta proteína, identificaram os melhores resultados de adsorção da NS1, para os ensaios com a amostra A2 de NS1-DENV2, em Gradiente Degrau 35 min (presença de 6 amostras contendo a NS1 na etapa de eluição – cerca de 50% das amostras eluídas da coluna) e Gradiente Linear 30 min (presença de 5 amostras contendo a NS1 – cerca de 40% das amostras eluídas). Entretanto, nestas amostras existe a presença de outras proteínas, tendo em vista que, as condições utilizadas favoreceram a adsorção de praticamente todas as proteínas presentes na amostra inicial, como por exemplo, a albumina. Com isso se faz necessário realizar estudos com variação de pH e força iônica, com o objetivo de adsorver preferencialmente a proteína NS1.

Salienta-se também neste trabalho as dificuldades encontradas em se trabalhar com volumes baixos nas etapas cromatográficas, tendo em vista que, este volume baixo não permite que sejam realizados ensaios sucessivos com a mesma amostra, a fim de se otimizar as condições de adsorção para proteína de interesse. Normalmente para melhores condições de adsorção em ensaios cromatográficos, são realizados com estudos de variação de pH e força iônica para averiguar quais desses parâmetros devem ser utilizados para se obter significativa pureza da biomolécula de interesse. No caso deste trabalho o objetivo era determinar um protocolo cromatográfico para purificação da proteína NS1-DENV2 oriundas de meio de cultivo de células infectadas de forma rápida e eficaz, o que apresentou perfis interessantes a serem trabalhados em estudos futuros, quanto a aplicação de duas etapas cromatográficas para purificação da NS1.

REFERÊNCIAS

- ALCON, S.; TALARMIN, A.; DEBRUYNE, M.; FALCONAR, A.; DEUBEL, V.; FLAMAND, M. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. **J Clin Microbiol**, v. 40, n. 2, p. 376-81, Feb 2002.
- ALEXANDRATOS, S. D. Ion-Exchange Resins: A Retrospective from Industrial and Engineering Chemistry Research. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 48, p. 388–398, 2009.
- AMORIM, J. H.; ALVES, A. M. B.; FERREIRA, L. C. S. F. A vacina contra a dengue: perspectivas e desafios. **Mic. Foco**. São Paulo, v. 10, p. 4-9, 2009.
- AMORIM, J. H.; PORCHIA, B. F. M. M.; BALAN, A.; CAVALCANTE, R. C. M.; COSTA, S. M.; ALVES, A. M. B.; FERREIRA, L. C. S. Refolded dengue virus type 2 NS1 protein expressed in *Escherichia coli* preserves structural and immunological properties of the native protein. **J. Virol. Methods**, v. 167, p. 186–192, 2010.
- ANAND, V.; KANDARAPU, R.; GARG, S. **Ion-exchange resins: Carrying drug delivery forward Drug Discovery Today**, 2001.
- ANANDARAO, R.; Swaminathan, S.; Sirimali, F.; Asha, M. J.; Navin, K. Recombinant multiepitope protein for early detection of dengue infections. **Clin Vaccine Immunol**, v. 13, n. 1, p. 59-67, Jan 2006.
- ARCANJO, Maria Rosiene Antunes. **Estudo da adsorção de ácido láctico por cromatografia de troca iônica**. 2014. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Programa de Pós Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará – UFC, Fortaleza, Ceará, 2014.
- ASSENBERG, R.; MASTRANGELO, E.; WALTER, T. S.; VERMA, A.; MILANI, M.; OWENS, R. J.; STUART, D. I.; GRIMES, J. M.; MANCINI, E. J. Crystal structure of a novel conformational state of the flavivirus NS3 protein: implications for polyprotein processing and viral replication. **J Virol**, v. 83, n. 24, p. 12895-906, Dec 2009.
- AVIRUTNAN, P. ZHANG, L.; PUNYADEE, N.; MANUYAKORN, A.; PUTTIKHUNT, C.; KASINRERK, W.; MALASIT, P.; ATKINSON, J. P.; DIAMOND M.S. Secreted NS1 of dengue virus attaches to the surface of cells via interactions with heparan sulfate and chondroitin sulfate E. **PLoS Pathog**, v. 3, n. 11, p. 183, 2006.
- AYYAR, B. V.; ARORA, S.; MURPHY, C.; O'KENNEDY, R. Affinity chromatography as a tool for antibody purification. **Methods**, v. 56, n. 2, p. 116-29, 2012.
- BALTIMORE, D. Expression of animal virus genomes. **Bacteriological reviews**, v. 35, n. 3, p. 235– 41, set. 1971.
- BAYRAMOĞLU, G.; SENEL, A. U.; ARICA, M. Y. Adsorption of IgG on spacer-arm and

L-arginine ligand attached poly (GMA/MMA/EGDMA) beads. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 104, n. 1, p. 672-679, 2007.

BIOSCIENCES, A. Chromatography. **Methods**, p. 160, 2002.

BLANC, C. L.; THEOLEYRE, M. A.; LUTIN, F.; PAREAU, D.; STAMBOULI, M. Purification of organic acids by chromatography: Adsorption isotherms and impact of elution flow rate. **Separation and Purification Technology**, v. 141, p. 105–112, 2015.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemical**. v. 72, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Cartilha da dengue**. Brasília, 2012. Disponível em <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/flash/cartilha_dengue.html>. Acesso em: 29 out. 2012.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. Chapter 3: Exploring Proteins and Proteomes. In: **Biochemistry**. p. 93–94, 2007.

BRESOLIN, I. T. L.; SOUZA, M. C. M.; BUENO, S. M. A. A new process of IgG purification by negative chromatography: Adsorption aspects of human serum proteins onto ω -aminodecyl-agarose. **Journal of Chromatography B**, v. 878, n. 23, p. 2087-2093, 2010.

BODAMER, G. W.; KUNIN, R. Behavior of Ion Exchange Resins in Solvents Other Than Water - Swelling and Exchange Characteristics. **Industrial & Engineering Chemistry**, v. 45, n. 11, p. 2577–2580, 1953.

CANOA, P.; VÁZQUEZ, S. R.; POPPLEWELL, J.; FERNANDEZ, G. A. A quantitative binding study of fibrinogen and human serum albumin to metal oxide nanoparticles by surface plasmon resonance. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 74, p.376-383. 2015.

CAVAZOS, R. I. L. JUNGHANNS, C.; SOTO, O. N.; CHÁVEZ, C. L. D.; LUNA, H. C.; DERMARCHE, P.; ENAUD, E.; MORALES, G. R.; AGHATOS, N. S.; PARRA, R. Purification and characterization of two thermostable laccases from *Pycnoporus sanguineus* and potential role in degradation of endocrine disrupting chemicals. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 108, p.32-42, 2014

CHAMBERS, T. J. HAHN C.S.; GALLER R.; RICE C.M.; Flavivirus genome organization, expression, and replication. **Annu Rev Microbiol**, v. 44, p. 649-88, 1990.

CHAMBERS, T. J.; MCCOURT, D. W.; RICE, C. M. Yellow fever virus proteins NS2A, NS2B, and NS4B: identification and partial N-terminal amino acid sequence analysis. **Virology**, v. 169, n. 1, p. 100-9, Mar 1989.

CHANG, G. J.; LANCIOTTI, R. S.; CALISHER, C. H.; GUBLER, D. J.; VORNDAM, A. V. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol**. v. 30. p. 545-551, 1992.

CHART, H.; Smith H. R.; La Ragione, R. M.; Woodward, M. J. An investigation into the pathogenic properties of Escherichia coli strains BLR, BL21, DH5alpha and EQ1. **J Appl Microbiol**, v.89, p.1048-1058, 2000.

CHIANG, C. Y.; HUANG, M. H.; HSIEH, C. H.; CHEN, M. Y.; LIU, H. H.; TSAI, J. P.; LI, Y. S.; CHANG, C. Y.; LIU, S. J.; CHONG, P.; LENG, C. H.; CHEN, H. W. Dengue-1 envelope protein domain III along with PELC and CpG oligodeoxynucleotides synergistically enhances immune responses. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v.6, p. e1645, 2012.

CIOTA, A.; KRAMER, L. Insights into Arbovirus Evolution and Adaptation from Experimental Studies. **Viruses**, v. 2, p. 2594-2617, 2010.

COSTA, S. M.; FREIRE, M. S.; ALVES, A. M. DNA vaccine against the non-structural 1 protein (NS1) of dengue 2 virus. **Vaccine, Amsterdam**, v. 24, n. 21, p. 4562-4564, 2006.

COMMINGS, D.E.; MIGUEL, A.G.; LESSER, B.H. Nuclear proteins. VI. Fractionation of chromosomal non-histone proteins using hydrophobic chromatography. **Biochem Biophys. Acta** 563, 253 – 260, 1979.

CREN, E. C. **Processamento de soluções graxas em resina de troca iônica**. 2009. 100 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, 2009.

CUTLER, P. Affinity chromatography. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 59, p. 157–168, 1996.

D'AGOSTINO, B. BELLOFIORE, P.; MARTINO, T.; PUNZO, C.; RIVIECCIO, V.; VERDOLIVA, A. Affinity purification of IgG monoclonal antibodies using the D-PAM synthetic ligand: chromatographic comparison with protein A and thermodynamic investigation of the D-PAM/IgG interaction. **Journal of Immunological Methods**, v. 333, n. 1–2, p. 126–138, 2008.

DENIZLI, A.; PIŞKIN, E. Dye-ligand affinity systems. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 49, n. 1–3, p. 391-416, 2001.

DONG, S.; CHANG, Y.; SHEN, J.; XUE, C.; CHEN, F. Purification, expression and characterization of a novel alfa-l-fucosidase from a marine bacteria Wenyingzhuangia fucanilytica. **Protein Expression and Purification**. v. 129, p.9-17, 2017.

EFFLER, P. V.; PANG, L.; KITSUTANI, P.; VORNDAM, V.; NAKATA, M.; AYERS, T.; ELM, J.; TOM, T.; REITER, P.; RIGAU-PEREZ, G. J.; HAYES, M. J.; MILLS, K.; NAPIER, M.; CLARK, G. G.; GUBLER, J. D. Dengue fever, Hawaii, 2001-2002. **Emerg Infect Dis**, v. 11, n. 5, p. 742-9, 2005.

ELENA, S. F. WHITTAM, T. S.; WINKWORTH, C. L.; RILEY, M. A.; LENSKI, R. E. Genomic divergence of Escherichia coli strains: evidence for horizontal transfer and variation in mutation rates. **Int Microbiol**, v. 8, n. 4, p. 271-8, Dec 2005.

ERIKSSON, K.-O. Hydrophobic interaction chromatography. In: JANSON, J.-C.; RYDEN, L. (Ed.). **Protein purification: principles, high resolution methods, and applications**.

2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 1998. p. 283-309.

FALCONAR A.K.; YOUNG P.R., Immunoaffinity purification of native dimer forms of the flavivirus non-structural glycoprotein, NS1, **J. Virol. Methods** v. 30 p. 323–332, 1990.

FAUSNAUGH, J.L.; KENNEDY, L.A.; REGNIER, F. E. Comparison of hydrophobic-interaction and reversed-phase chromatography of proteins. **J. Chromatogr.** 317, 141-155, 1984.

FAUSNAUGH, J.L.; REGNIER, F.E. Solute and mobile phase contributions to retention in hydrophobic interaction chromatography of proteins. **J. Chromatogr.** 359, 131–146, 1986.

GAGNON, R. K.; MORELAND, J. N.; RUEDL, C.; VASUDEVAN. G. S. Expression and immunoaffinity purification of recombinant dengue virus 2 NS1 protein as a cleavable SUMOstar fusion. **Protein Expression and Purification**, v. 82 p 20–25 2012.

GE HEALTHCARE **Affinity chromatography, principle and methods**. 2007.

GE HEALTHCARE. **Strategies for Protein Purification Handbook**. p. 167, 2010.

GE HEALTHCARE. **Con A Sepharose 4B**. Disponível em: <
<https://www.gelifesciences.com/shop/chromatography/resins/affinity-specific-groups/con-a-sepharose-4b-p-05883?current=17044001>>. 2017.

GEISBERGER, R.; LAMERS, M.; ACHATZ, G. The riddle of the dual expression of IgM and IgD. **Immunology**, 2006.

GHOSE, S.; JIN, M.; LIU, J.; HICKEY, J.; LEE, S. Integrated polishing steps for monoclonal antibody purification. In: GOTTSCHALK, U. (Ed.) **Process scale purification of antibodies**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2009. p. 145-167.

GUBLER, D. J.; MELTZER, M. Impact of dengue/dengue hemorrhagic fever on the developing world. **Adv. Virus Res.** v.53, p. 33- 70, 1999.

GONDIM, D.; LIMA, P. L.; DE SOUZA, M. C. M.; BRESOLIN, L. T. I.; ADRIANO, S. W.; AZEVEDO, S. C. D.; SILVA, J. I.; Dye Ligand Epoxide Chitosan/Alginate: A Potential New Stationary Phase for Human IgG Purification. **Adsorption Science & Technology**, v. 30, n. 8, p. 701-712, 09/01/ 2012.

GONDIM, D. R.; DIAS, N.; BRESOLIN, L. T. I.; BAPTISTIOLLI, M. A.; AZEVEDO, S. C. D.; SILVA, J. I. Human IgG adsorption using dye-ligand epoxy chitosan/alginate as adsorbent: influence of buffer system. **Adsorption-Journal of the International Adsorption Society**, v. 20, n. 8, p. 925-934, 2014.

GUÉLAT, B.; STRÖHLEIN, G.; LATTUADA, M.; MORBIDELLI, M. Electrostatic model for protein adsorption in ion-exchange chromatography and application to monoclonal antibodies, lysozyme and chymotrypsinogen A. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 35, p. 5610–5621, 2010.

GUO, X.; CHANG, R. K.; HUSSAIN, M. A. Ion-exchange resins as drug delivery

carriers *Journal of Pharmaceutical Sciences*. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v 98, p. 3886-3902, 2009.

HAGE, D. S. Affinity chromatography: a review of clinical applications. **Clinical chemistry**, v. 45, n. 5, p. 593–615, 1999.

HANG, V. T.; NGUYET, N. M.; TRUNG, D.T.; TRICOU, V.; YOKSAN, S.; DUNG, N. M.; VAN NGOC, T.; HIEN, T. T.; FARRAR, J.; WILLS, B.; SIMMONS, C. P. Diagnostic accuracy of NS1 ELISA and lateral flow rapid tests for dengue sensitivity, specificity and relationship to viraemia and antibody responses. **PLoS Negl. Trop. Dis.** 1, 360, 2009

HAHN, Y. S.; CALLER, R.; HUNKAPILLER, T.; DALRYMPLE, M. J.; STAUSS, H. J.; STRAUSS, G. E. Nucleotide sequence of dengue 2 RNA and comparison of the encoded proteins with those of other flaviviruses. **Virology**, v.162, p.167-180. 1988..

HALSTEAD, S. B. The pathogenesis of dengue. Molecular epidemiology in infectious disease (the Alexander D. Langmuir Lecture). **Am. J. Epidemiol.**, v. 114, p. 632-648, 1981.

HELFFERICH, F. Ion-Exchange Kinetics. **J. Phys. Chem.**, v. 69, n. 4, p. 1178–1187, 1965.

HERMANS, P.; ADAMS, H.; DETMERS, F. Purification of antibodies and antibody fragments using CaptureSelect affinity resins. **Methods in Molecular Biology**, v. 1131, p. 297-314, 2014.

HIESTER, N. K.; VERMEULEN, T. Saturation performance of ion-exchange and adsorption columns. **Chem. Eng. Prog.**, v. 48, p. 505–516, 1952.

IRVINE, G.B. High-performance size-exclusion chromatography of peptides. **J. Biochem. Biophys. Meth.**, 56, 233-242, 2003.

JOHNSON, W. C.; BUHRMAN, G.; TING, Y. P.; COLICELLI, J.; MATTOSA, C. Expression, purification, crystallization and X-ray data collection for RAS and its mutants. **Data in Brief**. v. 6, p.423-427, 2016.

KAMIONKA, M. Engineering of therapeutic proteins production in *Escherichia coli*. **Curr Pharm Biotechnol**, v. 12, n. 2, p. 268-74, 2011.

KAPOOR, M., ZHANG, L.; RAMACHANDRA, M.; KUSUKAWA, J.; EBNER, K. E.; PADMANABHAN, R.; Association between NS3 and NS5 proteins of dengue virus type 2 in the putative RNA replicase is linked to differential phosphorylation of NS5. **J Biol Chem**, v.270, p.19100-19106. 1995.

KIMURA, R.; HOTTA, S. On the inoculation of dengue virus into mice. **Nippon Igaku**, v. 3379, p. 629-633, 1944.

KOSTANSKI, L.K.; KELLER, D. M.; HAMIELEC, A. E. Size-exclusion chromatography-a review of calibration methodologies. **J. Biochem. Biophys.** v. 58, 159-186, 2004.

KOURI, G. P.; GUZMAN, M. G.; BRAVO, J. R.; TRIANA, C. Dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome: lessons from the Cuban epidemic, 1981. **Bull World Health**

Organ, v. 67, n. 4, p. 375-80, 1989.

KROSCHEWSKI, H. Lim S. P.; Butcher, R. E.; Yap, T. L.; Lescar, J.; Wright, P. J.; Vasudevan, S. G.; Davidson, A. D. Mutagenesis of the dengue virus type 2 NS5 methyltransferase domain. **J Biol Chem**, v. 283, n. 28, p. 19410-21, 2008.

LEFORT, S.; FERRARA, P. Hydrophobic adsorbents for the isolation and purification of biosynthetic human growth hormone from crude. **J Chromatogr.** v. 27. p. 209-216. 1986.

LEUNG, J. Y. PIJLMAN, P. G.; KONDRATIEVA¹, N.; HYDE¹, J.; MACKENZIE, M. J.; KHROMYKH, A. A. Role of nonstructural protein NS2A in flavivirus assembly. **J Virol**, v. 82, n. 10, p. 4731-41, 2008.

LIBRATY, D. H. YOUNG P. R.; PICKERING, D.; ENDY, T. P.; KALAYANAROOJ, S.; GREEN, S.; VAUGHN D. W.; NISALAK, A.; ENNIS F. A.; ROTHMAN A. L. High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. **J Infect Dis**, v. 186, n. 8, p. 1165-8, Oct 15 2002.

LIMA, Micael de Andrade. **Recuperação e purificação de β -galactosidase de Kluyveromyces lactis utilizando cromatografia de modo misto**. 2014. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Programa de Pós Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará – UFC, Fortaleza – CE, 2014

LINDENBACH, B. D.; THIEL, H. J.; CHARLES M. RICE, C. M. Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. **Fields Virology**, v.2, p.1102-1152, 2007.

LUO, D. Xu, T.; Hunke, C.; Grüber, G.; Vasudevan, S. G.; Lescar, J. Crystal structure of the NS3 protease-helicase from dengue virus. **J Virol**, v. 82, n. 1, p. 173-83, Jan 2008.

MACKENZIE, J. M.; JONES, M. K.; YOUNG, P. R. Immunolocalization of the dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication. **Virology**, v. 220, n. 1, p. 232-40, Jun 1 1996.

MAHAJAN, V. S.; MATTO, H.; DESHPANDE, V.; PILAI, S. S.; STONE, J. H. IgG4-Related Disease. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 9, n. 1, p. 315–347, 2014.

MARIAM, S. H. S.; OOI, C. W.; TAN, W. S.; JANNA, O. A.; ARBAKARIYA, A.; TEY, B. T. Purification of rabbit polyclonal immunoglobulin G with ammonium sulphate precipitation and mixed-mode chromatography. **Separation and Purification Technology**. v 144, 133-138, 2015.

MARQUES, L. G. **Liofilização de frutas tropicais**. 255p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, SP. 255p. 2008.

MELANDER, W.; HORVATH, C. Salt effects on hydrophobic interaction in precipitation and chromatography of proteins: an interpretation of lyotropic series. **Arch. Biochem Biophys.** v183, 200-215, 1977.

MILLER, S.; SPARACIO, S.; BARTENSCHLAGER, R. Subcellular localization

and membrane topology of the Dengue virus type 2 Non-structural protein 4B. **J Biol Chem**, v. 281, n. 13, p. 8854-63, 2006.

MILLER, J. M. **Chromatography: Concepts and Contrasts: Second Edition**. s.l: s.n., 2013

MILLIPORE, C. **Amicon Pro Purification System User Guide**. Disponível em < https://www.milian.com/data/pdf_guides/en/amicon_pro_user_guide.pdf>. 2003.

MILLIPORE, C. **Millipore extends Amicon, offers chromatography filter**. Disponível em < https://www.milian.com/data/pdf_guides/en/amicon_pro_user_guide.pdf>. 2014.

MORBIDELLI, M. Purification of monoclonal antibodies by continuous chromatography (MCSGP). **New Biotechnology**, v. 25, Supplement, p. 172-S173, 2009.

MODIS, Y. OGATA, S.; CLEMENTS, D.; STEPHEN C. Harrison Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. **Nature**, v. 427, n. 6972, p. 313-9, Jan 22 2004.

MUKHOPADHYAY, S.; KUHN, R. J.; ROSSMANN, M. G. A structural perspective of the flavivirus life cycle. **Nat Rev Microbiol**, v. 3, n. 1, p. 13-22, Jan 2005.

MUSSO, D.; GUBLER, D. J. Zika Virus. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 29, p. 487–524, 2016.

ODABAŞI, M.; DENIZLI, A. Cibacron Blue F3GA-attached magnetic poly(2-hydroxyethyl methacrylate) beads for human serum albumin adsorption. **Polymer International**, v. 53, p. 332-338, 2004.

OISHI, K.; SAITO, M.; MAPUA, C.A.; NATIVIDAD, F. F. Dengue illness: clinical features and pathogenesis. **J Infect Chemother**, v. 13, n. 3, p. 125-33, Jun 2007.

PAROUTIS, P.; TOURET, N.; GRINSTEIN, S. The pH of the secretory pathway: measurement, determinants, and regulation. **Physiology (Bethesda)**, v. 19, p. 207-15, Aug 2004.

PERERA, R.; KUHN, R. J. Structural proteomics of dengue virus. **Curr Opin Microbiol**, v. 11, n. 4, p. 369-77, Aug 2008.

PERICH, M. J. DAVILA G. D.; TURNER, A.; GARCIA, A.; NELSON, M. Behavior of resting *Aedes aegypti* (Culicidae: Diptera) and its relation to ultra-low volume adulticide efficacy in Panama City, Panama. **J Med Entomol**, v. 37, n. 4, p. 541-6, Jul 2000.

PESSOA, J. A.; KLIKIAN, V. B. **Purificação de Produtos Biotecnológicos**. v. 1, 2005.

PONGSUMPUN, P.; GARCIA- LOPEZ, D.; FAVIER, C.; TORRES, L.; LLOSA, J.; DUBOIS, M.A. Dynamics of dengue epidemics in urban contexts. **Trop. Med. Int. Health** , v. 9, p. 1180-1187, 2008.

PORATH, J. Salt-promoted adsorption: recent developments. **J. Chromatogr.** 376, 331–341,

1986.

PORATH, J.; FLODIN, P. Gel filtration: a method for desalting and group separation. **Nature** 183: 1657-1659, 1959.

QUEIROZ, J.A.; GARCIA, F. A. P.; CABRAL, J.M.S. Purification of *Chromobacterium* *glaucum* lipase by hydrophobic interaction chromatography. **Isolat. Purif.** 3, 1-7, 1999.

QUEIROZ, J.A.; TOMAZ, C.T.; CABRAL, J.M.S. Hydrophobic interaction chromatography of protein. *J. Biotechnol.*, v. 87, p. 143-159, 2001.

REGNIER, F.E. The role of protein structure in chromatographic behavior. **Science**. v. 238, p. 319-323, 1987.

RICE, C. M. LENCHES E. M.; EDDY S.R; SHIN S.J.; SHEETS R.L.; STRAUSS J.H. Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. **Science**, v. 229, n. 4715, p. 726-33, Aug 23 1985.

ROE, S. Purification based on hydrophobicity. In: Harris, E.L.V., Angal, S. (Eds.), *Protein Purification Methods: A Practical Approach*. IRL Press, **Oxford**, pp. 221–232, 1989.

ROBERTS, M. W. H. et al. Versatility of polymethacrylate monoliths for chromatographic purification of biomolecules. **Journal of Separation Science**. 32: 2485-2496 p. 2009.

RUTHVEN, D. M. Physical Adsorption and the Characterization of Porous Adsorbents. In: **Principles of Adsorption and Adsorption Processes**. v. 19p. 433, 1985.

SAHDEV, S., KHATTAR, S. K. e SAINI, K. S. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. **Mol Cell Biochem**, v.307, p.249-264. 2008.

SAMPATH, A.; PADMANABHAN, R. Molecular targets for flavivirus drug discovery. **Antiviral Res.**, doi:10.1016/j.antiviral.2008.08.004, 2008.

SANTOS, O. S.; GONDIM, R. D.; AZEVEDO, C. S. D.; SILVA, J. I. JR. **Purificação de imunoglobulinas g (IgG) por cromatografia de afinidade utilizando matriz de quitosana/alginato com o corante Procion Red MX-5B imobilizado como fase estacionária**. XXI Congresso Brasileiro de Engenharia Química - COBEQ. Fortaleza, Ceará, 2016.

SILVA, Alan Henrique da. **Estudos de adsorção de ácidos orgânicos visando sua recuperação de meios fermentados**. 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas – SP, 2010.

SMITH, E. M. P. AND B. D. **Chapter 1: Applications of Synthetic Receptors for Biomolecules**. Department of Chemistry and Biochemistry, 236 Nieuwland Science Hall, University of Notre Dame, Notre Dame, 2015.

SOFER, G.K.; HAGEL, L. *Handbook of Process Chromatography: A Guide to*

Optimization, Scale-up and Validation. **Academic Press**, London, 1997.

STAAK, C. et al. Polystyrene as an affinity chromatography matrix for the purification of antibodies. **Journal of Immunological Methods**, v. 194, n. 2, p. 141-146, 1996.

STOHLMAN, S. A.; WISSEMAN, C. L.; EYLAR, O. R.; SILVERMAN, D. J.; Dengue virus-induced modifications of host cell membranes. **J Virol**, v. 16, n. 4, p. 1017-26, Oct 1975.

STOTT D. I. Immunoblotting and dot blotting. **J. Immun. Met.**, 119: 153-187. 1989.

TERPE, K. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.60, p.523-533, 2003.

TSUMOTO, K.; EJIMA, D.; SENCZUK, A. M.; KITA, Y.; ARAKAWA, T. Effects of salts on protein-surface interactions: Applications for column chromatography. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2007.

UNDERDOWN, B. J.; SCHIFF, J. M. Immunoglobulin A: strategic defense initiative at the mucosal surface. **Annu Rev Immunol**. v. 4 p. 389-417, 1986.

URH, M.; SIMPSON, D.; ZAO, K. Affinity Chromatography: General Methods. Chapter twenty-six. **Methods in Enzymology**. v. 463, p. 418-435, 2009.

VAN OSS, C.J.; GOOD, R.J.; CHAUDHURY, M.K. Nature of the antigen-antibody interaction. Primary and secondary bonds: optimal conditions for association and dissociation. **J. Chromatogr.** 376, 111–119, 1986.

VIJAYALAKSHMI, M. A. Pseudobioespecific ligand affinity chromatography. **Trends Biotechnol.** v. 7, p. 71, 1989.

WALKER J. M. **The Protein Protocols Handbook**. Third Edition. Springer-Verlag New York, LLC, 2009.

WESTAWAY, E. G.; GOODMAN, M. R. Variation in distribution of the three flavivirus-specified glycoproteins detected by immunofluorescence in infected Vero cells. **Arch Virol**, v. 94, n. 3-4, p. 215-28, 1987.

WHEELWRIGHT, S. M. **Protein purification design and scale up of downstream processing**. New York: John Wiley & Sons, 228 p, 1991

WINKLER, G.; RANDOLPH, V. B.; CLEAVES, G. R.; RYAN, T. E.; STOLLAR, V. Evidence that the mature form of the flavivirus nonstructural protein NS1 is a dimer. **Virology** 1, 187–196, 1988.

WONGCHUPHAN, R., TEY, T. B., TAN, W. S., TAIP, F. S., KAMAL, S. M. M., LING, T. C. Application of dye-ligands affinity adsorbent in capturing of rabbit immunoglobulin G. **Biochemical Engineering Journal**, v. 45, p. 232-238, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Media Centre: **Dengue and severe dengue**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>> Acesso em: 10

out. 2016b.

WU, S. L.; KARGER, B. L. Hydrophobic interaction chromatography of proteins. In: KARGER, B.L., HANCOCK, W.S. (Eds.), High Resolution Separation and Analysis of Biological Macromolecules, Fundamentals. **Methods Enzymology**, vol. 270. **Academic Press Inc**, London, pp. 27–47, 1986.

WU, F.; ZHU, Y.; JIA, Z. Preparation of dye-ligand affinity chromatographic packings based on monodisperse poly(glycidylmethacrylate-co-ethylenedimethacrylate) beads and their chromatographic properties. **Journal of Chromatography A**, v. 1134, n. 1–2, p. 45–50, 2006.

YAGINUMA, Sandra Regina. **Extração e purificação parcial de inulina a partir de yacon (*Smallanthus sonchifolius*) por adsorção em resinas de troca iônica**. 2007. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis – SC, 2007.

YAP, T. L.; XU, T.; CHEN, Y. L.; MALET, H.; EGLOFF, M. P.; CANARD, B.; VASUDEVAN, S. G.; LESCAR, J. Crystal structure of the dengue virus RNA-dependent RNA polymerase catalytic domain at 1.85-angstrom resolution. **J Virol**, v. 81, n. 9, p. 4753-65, May 2007.

YAVUZ, H. SINAN, A.; RIDVAN, S.; ADIL, D. Affinity separation of immunoglobulin G subclasses on dye attached poly (hydroxypropyl methacrylate) beads. **Int J Biol Macromol**, v. 39, n. 4-5, p. 303-9, Nov 15 2006.

YOUNG, P. R. HILDITCH, P. A.; BLETCHLY, C.; HALLORAN, W. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. **J Clin Microbiol**, v. 38, n. 3, p. 1053-7, Mar 2000.

YOHAN, B.; WARDHANI, P.; ARYATI.; TRIMARSANTO, H.; SASMONO, T. R. Production of recombinant dengue non-structural 1 (NS1) proteins from clinical virus isolates. **Protein Expr Purif**. v. 129, Pages 53-59, 2016.

XI, F.; WU, J. Macroporous chitosan layer coated on non-porous silica gel as a support for metal chelate affinity chromatographic adsorbent. **Journal of Chromatography A**, v. 1057, n. 1–2, p. 41-47, 2004.

XU, H.; DI, B.; PAN, Y. X.; QIU, L. W.; WANG, Y. D.; HAO, W.; HE, L. J.; YUEN, K. Y.; CHE X. Y. Serotype 1-specific monoclonal antibody-based antigen capture immunoassay for detection of circulating nonstructural protein NS1: Implications for early diagnosis and serotyping of dengue virus infections. **J Clin Microbiol**, v. 44, n. 8, p. 2872-8, Aug 2006.

ZHANG, Y. CORVER, J.; CHIPMAN, R. P.; ZHANG, W.; PLETNEV, V. S.; SEDLAK, D.; BAKER, S. T.; STRAUSS, H. J.; RICHARD J. KUHN, J. R.; MICHAEL G. ROSSMANN, G. M. Structures of immature flavivirus particles. **EMBO J**, v. 22, n. 11, p. 2604-13, Jun 2 2003.

ZHANG, Y.; Kaufmann, B.; Chipman, R. P.; Kuhn, J. R.; Rossmann, G. M. Structure of

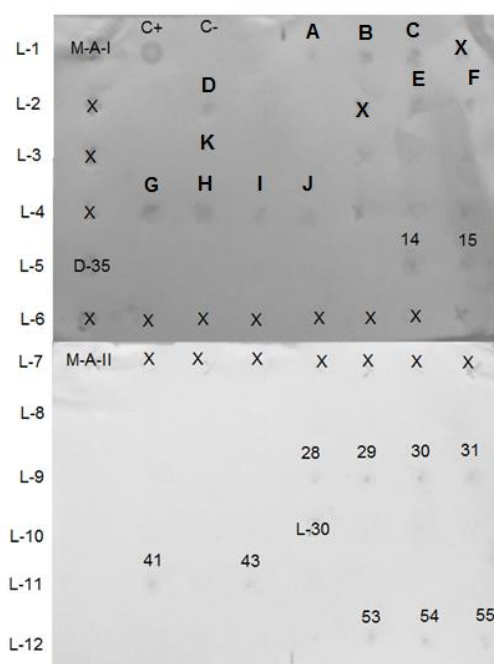
immature West Nile virus. **J Virol**, v. 81, n. 11, p. 6141-5, Jun 2007.

ZUÑIGA, A. D. G. et al. Revisão: Técnicas Usadas No Processo De Purificação De Biomoléculas. **Boletim Ceppa**, v. 21, n. 1, p. 61–82, 2003.

ANEXO A – MEMBRANAS UTILIZADAS NA TÉCNICA DOT-BLOT (DB)

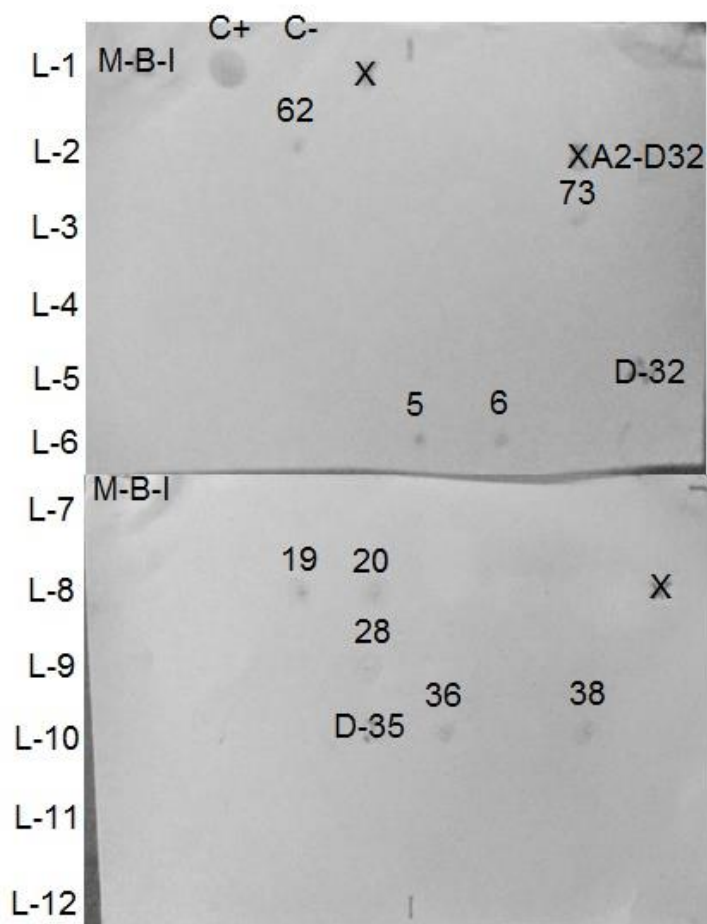
Primeira Membrana Dot-Blot (M-A)

Dot Blot (DB) das amostras coletadas nos ensaios em Gradiente Degrau 35 min e Linear 30 min, da amostra A2 de NS1-DENV2 diluída 2x em Tampão Tris/HCl pH 8,0, em coluna aniônica Hitrap QFF. Descrição dos Dot-Blots Letras: (C+) Controle Positivo – Presença de NS1 Recombinante; (C-) Controle Negativo – Sobrenadante L-15 sem a presença de NS1; Na M-A-I, (A) Amostra bruta inicial A1 de NS1-DENV2; (B) Amostra A1 retida no filtro de 50 kDa [M50 (2)]; (C) Amostra A1 retida no filtro de 50 kDa [M50(4)]; (D) Amostra A1 que passou do filtro de 50 kDa [m50(4)]; (E) Amostra A1 que passou na 1º Centrifugação do filtro de 50 kDa [m50(1)] e ficou retida no filtro de 30 kDa [M50-30(1)]; (F) Amostra A1 que passou na 4º Centrifugação do filtro de 50 kDa [m50(4)] e ficou retida no filtro de 30 kDa [M50-30(4)]; (G) Amostra A2 retida no filtro de 50 kDa [M50 (1)]; (H) Amostra A2 retida no filtro de 50 kDa [M50 (2)]; (I) Amostra A2 que passou na 1º Centrifugação do filtro de 50 kDa [m50(1)] e ficou retida no filtro de 30 kDa [M50-30(1)]; (J) Amostra A2 que passou na 2º Centrifugação do filtro de 50 kDa [m50(2)] e ficou retida no filtro de 30 kDa [M50-30(2)]; (K) Amostra Bruta inicial A2 de NS1-DENV2; (D-35) Amostras Gradiente Degrau 35 min - Amostras que marcaram NS1. Na membrana M-A-II, Gradiente Degrau 35 min – Amostras que marcaram NS1. Na M-A-II, (L-30) Amostras Gradiente Linear 30 min - Amostras que marcaram NS1; (X) Nenhuma mostra injetada no Dot-Blot



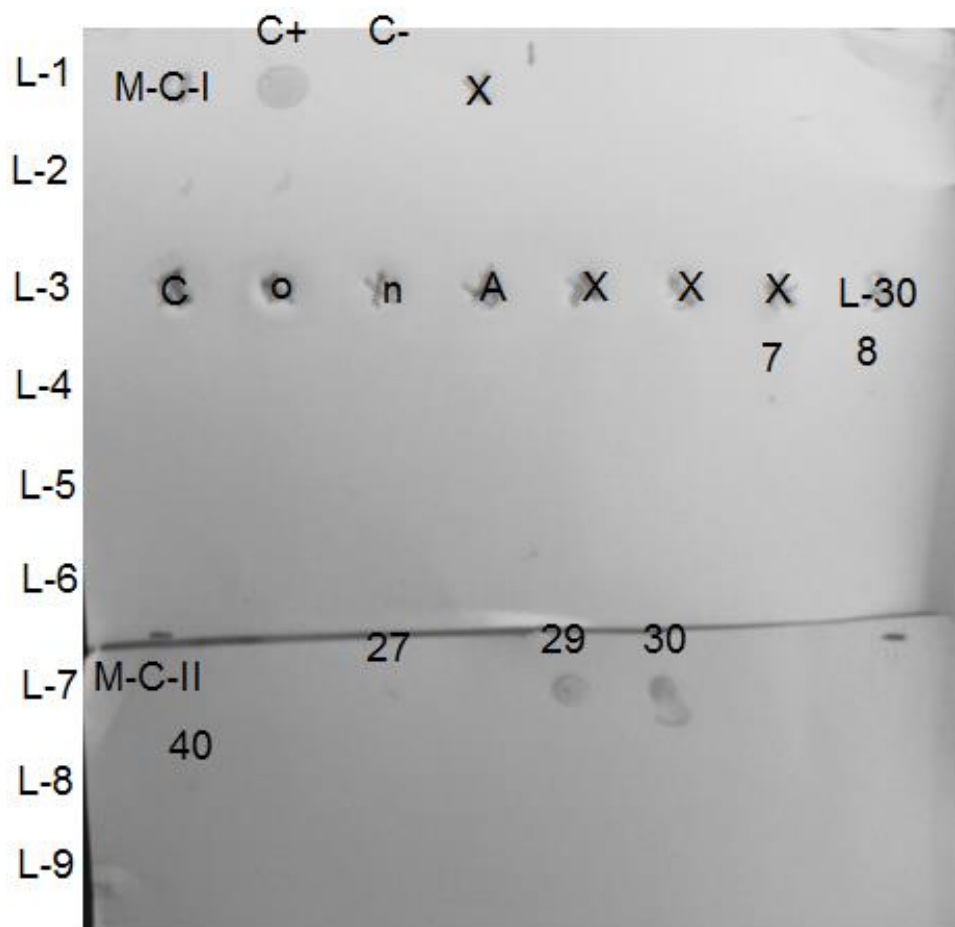
Segunda Membrana Dot-Blot (M-B)

Dot Blot (DB) das amostras coletadas nos ensaios em Gradiente Degrau 32 min e Gradiente Degrau 35 min, da amostra A1 [M50 (1-5)] de NS1-DENV2 diluída 2x em Tampão Tris/HCl pH 8,0, em coluna aniônica Hitrap QFF. Descrição dos Dot-Blots visíveis na Membrana M-B-I e M-B-II, Letras: (C+) Controle Positivo – Presença de NS1 Recombinante; (C-) Controle Negativo – Sobrenadante L-15 sem a presença de NS1; Na M-B-I, (D-32) Amostras Gradiente Degrau 32 min - Amostras que marcaram NS1: (5) e (6) - Amostras 5 e 6 referentes a etapa de lavagem (Pico 1) do 1º Ensaio com amostra A1 [M50 (1-5)] diluída 2x em Tampão Tris/HCl pH 8,0 em Gradiente Degrau 32 min; Na membrana M-B-II, Gradiente Degrau 32 min – Amostras que marcaram NS1: (19), (20) e (28) - Amostras 19 e 20 referente primeira etapa do Gradiente Degrau 32 min e Amostra 28, referente a terceira etapa do Gradiente Degrau 32 min; Na M-A-II, (D-35) Amostras Gradiente Degrau 35 min - Amostras que marcaram NS1: (36) e (38) - Amostras 36 e 38 referentes ao início da etapa de lavagem (Pico 1), 2º Ensaio com amostra A1 [M50 (1-5)] em Gradiente Degrau 32 min; (X) Nenhuma mostra injetada no Dot-Blot;



Terceira Membrana Dot-Blot (M-C)

Dot Blot (DB) das amostras coletadas no ensaio em Sistema FPLC, com Gradiente Linear 30 min, da amostra A3 de NS1-DENV2 diluída 5x em Tampão Fosfato de Sódio pH 5,9, em coluna de afinidade Hitrap Concanavalina A. Descrição dos Dot-Blots visíveis na Membrana M-C-I e M-C-II, Letras: (C+) Controle Positivo – Presença de NS1 Recombinante; (C-) Controle Negativo – Sobrenadante L-15 sem a presença de NS1; Na M-C-I, (ConA L-30) Amostras Gradiente Linear 30 min - Amostras que marcaram NS1: (7) e (8) - Amostras 7 e 8 referentes a etapa de lavagem (Pico 1) do Ensaio com amostra A3 diluída 5x em Tampão Fosfato de Sódio pH 5,9 em Gradiente Linear 30 min; Na membrana M-C-II, Amostras que marcaram NS1: (27), (29) e (30) - Amostras 27, 29 e 30 são referentes ao início da etapa de eluição (Pico 2) do Gradiente Linear 30 min; Amostra 40, coletada após ao Pico 2 da eluição, no intervalo de coleta de 2 em 2 min; (X) Nenhuma mostra injetada no Dot-Blot;



Quarta Membrana Dot-Blot (M-D)

Dot Blot (DB) das amostras coletadas nos dois ensaios com a amostra A5 de NS1-DENV2 diluída 2x com tampão Fosfato de Sódio pH 5,9 25 mM, em Sistema de Leito Fixo Convencional, com coluna C10/10 empacotada com corante Procion Red MX-5B, utilizando Eluição Isocrática de 30 min. Descrição dos Dot-Blots visíveis na Membrana M-D-I e M-D-II, Letras: (C+) Controle Positivo – Presença de NS1 Recombinante; (C-) Controle Negativo – Sobrenadante L-15 sem a presença de NS1; Na M-D-I, Amostras 1º Ensaio com Corante PR-MX5B-QAE – Eluição isocrática 30 min - Amostras que marcaram NS1: (29), (31), (36) e (37) - Amostras 29, 31, 36 e 37 referentes a etapa de eluição isocrática coletadas a parti de 29 min do Ensaio com amostra A5 diluída 2x em Tampão Fosfato de Sódio pH 5,9; Na membrana M-D-II, (E2) – 2º Ensaio com amostra A5 diluída 2x em Tampão Fosfato de Sódio pH 5,9 com corante PR-MX5B-QAE - Amostra que marcou NS1: (31) - Amostra 31 referente a etapa de

eluição isocrática coletadas a parti de 29 min do Ensaio com amostra A5 diluída 2x em Tampão Fosfato de Sódio pH 5,9; (X) Nenhuma mostra injetada no Dot-Blot;

