



## CONCENTRAÇÃO DE PARTÍCULAS PSEUDOVIRAIS DE ZIKA VÍRUS POR ULTRAFILTRAÇÃO

Maycou Soares Zamprognio

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientadoras: Leda dos Reis Castilho  
Helen Conceição Ferraz

Rio de Janeiro  
Fevereiro de 2019

CONCENTRAÇÃO DE PARTÍCULAS PSEUDOVIRAIS DE ZIKA VÍRUS POR  
ULTRAFILTRAÇÃO

Maycou Soares Zamprognio

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO LUIZ COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA (COPPE) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS EM ENGENHARIA QUÍMICA.

Examinada por:

---

Prof. Leda dos Reis Castilho, Dr.Ing.

---

Prof. Tito Lívio Moitinho Alves, D.Sc.

---

Prof. Maria Alice Zarur Coelho, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ – BRASIL  
FEVEREIRO DE 2019

Zamprognio, Maycou Soares

Concentração de Partículas Pseudovirais de Zika Vírus por Ultrafiltração/Maycou Soares Zamprognio. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2019.

XXII, 92 p.: il.; 29,7cm.

Orientadoras: Leda dos Reis Castilho

Helen Conceição Ferraz

Dissertação (mestrado) – UFRJ/COPPE/Programa de Engenharia Química, 2019.

Referências Bibliográficas: p. 73 – 86.

1. Flavivírus. 2. Zika. 3. Partícula pseudoviral.  
4. Concentração. I. Castilho, Leda dos Reis *et al.* II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Química. III. Título.

*"Quando alguma pergunta tem  
tanto uma resposta longa,  
complicada e lógica quanto uma  
resposta simples, que pode ser  
entendida até por uma criança, a  
certa costuma ser a mais simples".  
(SUNIM, 2017)*

# Agradecimentos

À Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), agradeço a todos os funcionários que a mantêm através de árduo trabalho.

Ao Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa em Engenharia (COPPE), agradeço por toda a infraestrutura disponibilizada e pelo acesso ao elevado nível de profissionais.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), sou grato pela bolsa concedida ao longo deste trabalho.

Ao Laboratório de Engenharia de Cultivos Celulares e aos seus integrantes, agradeço pelo apoio e por toda ajuda fornecida durante meus experimentos. Em especial, agradeço à técnica do laboratório Renata Guimarães Ferreira Alvim e ao aluno de doutorado Túlio Macedo de Lima, pelo fornecimento de materiais para o meu trabalho; bem como ao técnico Wallace da Silva Abreu, pelas instruções ao longo das análises cromatográficas.

Às minhas orientadoras, Dra. Leda dos Reis Castilho e Dra. Helen Conceição Ferraz, agradeço por toda a compreensão e os conselhos fornecidos ao longo de minha pesquisa, imprescindíveis para este trabalho e minha trajetória profissional.

Aos meus pais e irmã, agradeço por estarem presentes, mesmo fisicamente distantes, e por todo apoio concedido.

Por fim, agradeço a Deus por ter me permitido, mesmo ao longo das dificuldades, concluir mais esta etapa de minha vida. Sou profundamente grato aos amigos e demais indivíduos que me apoiaram e ajudaram a consolidar esta conquista em minha trajetória profissional.

Resumo da Dissertação apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (M.Sc.)

## CONCENTRAÇÃO DE PARTÍCULAS PSEUDOVIRAIS DE ZIKA VÍRUS POR ULTRAFILTRAÇÃO

Maycou Soares Zamprognio

Fevereiro/2019

Orientadoras: Leda dos Reis Castilho

Helen Conceição Ferraz

Programa: Engenharia Química

Este trabalho investigou a separação de partículas pseudovirais (VLPs) de Zika vírus contidas em sobrenadante de cultivo celular através da operação de ultrafiltração. As VLPs foram produzidas por células da linhagem HEK293 - 3F6 (*Human Embryonic Kidney cells*) transfectadas com o vetor plasmidial comercial PCI-NEO® (Promega) contendo as sequências genéticas referentes às proteínas estruturais de pré-membrana (pr-M) e envelope (E) do vírus Zika. As técnicas utilizadas neste estudo compreenderam análises qualitativas, a partir dos métodos de *Immunoblot*, SDS-PAGE e *Western blot*; quantificação de proteínas, através de testes de densitometria e Bradford; bem como análise da distribuição de tamanho de partículas, ao utilizar a metodologia de HPLC/SEC-UV. Operações em bateladas sequenciais de 14 mL em dispositivo Vivaspin® contendo membranas de poliétersulfona (PES) com massa molecular de corte de 300 kDa e 1000 kDa foram investigadas e a membrana de menor *cut-off* apresentou maior eficiência de separação. Desta forma, os estudos posteriores em célula de ultrafiltração agitada Amicon® avaliou o emprego das membranas de PES de 500 kDa e celulose regenerada (RC) de 100 kDa, no qual a membrana de PES de 500 kDa apresentou qualitativamente melhor desempenho na retenção e concentração das VLPs.

Abstract of Dissertation presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.)

## CONCENTRATION OF ZIKA VIRUS-LIKE PARTICLES BY ULTRAFILTRATION

Maycou Soares Zamprognio

February/2019

Advisors: Leda dos Reis Castilho

Helen Conceição Ferraz

Department: Chemical Engineering

This work assessed the separation of virus-like particles (VLPs) through ultrafiltration operation. The VLPs were constitutively expressed by HEK293 - 3F6 cell line (*Human Embryonic Kidney cells*) transfected with commercial plasmidial vector PCI-NEO® (Promega) encoding the genetic sequences of premembrane (pr-M) and envelope (E) structural proteins of Zika virus. The assessment techniques were based on qualitative analysis, such as the Immunoblot test, SDS-PAGE and Western blot; protein quantification, through densitometry and Bradford assays; and the particle diameter distribution analysis by using HPLC/SEC-UV. Sequential batches of 14 mL in Vivaspin® devices embedded with polyethersulfone of 300 kDa and 1000 kDa membranes were analyzed and better performance was achieved with the lowest cut-off. Therefore, batch operations in agitated Amicon® cell filled with 200 mL of clarified supernatant were conducted with 500 kDa polyethersulfone and 100 kDa regenerated cellulose membranes. Despite both membranes showing concentration capacity to Zika virus-like particles, the PES membrane displayed higher efficiency.

# Sumário

<b>Lista de Figuras</b>	<b>xi</b>
<b>Lista de Tabelas</b>	<b>xvi</b>
<b>Lista de Símbolos</b>	<b>xviii</b>
<b>Lista de Abreviaturas</b>	<b>xx</b>
<b>1 Introdução</b>	<b>1</b>
1.1 Motivação . . . . .	2
1.2 Objetivos . . . . .	3
1.2.1 Objetivos específicos . . . . .	3
<b>2 Revisão Bibliográfica</b>	<b>4</b>
2.1 Os vírus e as vacinas virais . . . . .	4
2.1.1 Família <i>Flaviviridae</i> . . . . .	5
2.1.2 Partículas pseudovirais . . . . .	8
2.2 Processo <i>downstream</i> de produtos biofarmacêuticos . . . . .	9
2.3 Tecnologia de separação por membranas . . . . .	11
2.3.1 Filtração convencional e fenômenos de transporte associados . . . . .	13
2.3.2 Materiais poliméricos . . . . .	16
2.3.3 Ultrafiltração . . . . .	19
2.3.4 Considerações finais . . . . .	20



<b>3</b>	<b>Metodologia Experimental</b>	<b>22</b>
3.1	Obtenção do sobrenadante de cultivo celular . . . . .	22
3.2	Coleta e pré-tratamento do sobrenadante de cultivo celular contendo VLPs de Zika vírus . . . . .	23
3.3	Ultrafiltração de sobrenadante de cultivo celular para concentração de VLPs de Zika vírus . . . . .	23
3.3.1	Experimentos em batelada com dispositivos Vivaspin® com membranas de PES (300 kDa e 1000 kDa) . . . . .	24
3.3.2	Utilização de célula de ultrafiltração agitada (Amicon®) contendo membranas de RC (100 kDa) e PES (500 kDa) . . . . .	25
3.4	Técnicas analíticas . . . . .	28
3.4.1	Immunoblot: revelação e sua avaliação por densitometria . . . . .	29
3.4.2	Eletroforese em gel e revelação por nitrato de prata . . . . .	31
3.4.3	Ensaio de <i>Western blot</i> . . . . .	32
3.4.4	Determinação do teor de proteínas totais . . . . .	33
3.4.5	Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com coluna de exclusão molecular (SEC) . . . . .	33
<b>4</b>	<b>Resultados e Discussão</b>	<b>35</b>
4.1	Análise da etapa de microfiltração para clarificação de sobrenadante de cultivo celular . . . . .	37
4.2	Experimentos preliminares de ultrafiltração . . . . .	39
4.3	Ensaio de aumento de capacidade de ultrafiltração . . . . .	44
4.3.1	Estudo inicial de capacidade de concentração de VLPs de Zika vírus em PES (500 kDa) e RC (100 kDa) . . . . .	44
4.3.2	Efeito da pressão de operação sobre o desempenho das membranas . . . . .	51
4.3.3	Análise comparativa entre a retenção de VLPs de Zika vírus pelas membranas de PES (500 kDa) e RC (100 kDa) a 1,5 bar . . . . .	63
<b>5</b>	<b>Conclusões e Sugestões</b>	<b>71</b>

5.1	Conclusões . . . . .	71
5.2	Sugestões para trabalhos futuros . . . . .	72
	<b>Referências Bibliográficas</b>	<b>73</b>
<b>A</b>	<b>Autorizações de uso de imagem</b>	<b>87</b>
<b>B</b>	<b>Informações complementares</b>	<b>88</b>

# Lista de Figuras

2.1	Representação da estrutura do vírus <i>Zika</i> . Fonte: <i>Adaptado de VIRAL-ZONE/EXPASY (2016)</i> . . . . .	6
2.2	Distribuição de transmissões do vírus <i>Zika</i> - (Cinza): Países com transmissão de vírus <i>Zika</i> anterior ao surto dos Estados Federados da Micronésia em 2017. (Preto): Países com transmissão autóctone de vírus <i>Zika</i> . Fonte: <i>Adaptado de BASILE et al. (2017) apud BOGOCH et al. (2016); HENNESSEY et al. (2016); MAURER-STROH et al. (2016); YAKOB e WALKER (2016)</i> . . . . .	7
2.3	Micrografia eletrônica de transmissão de VLPs de <i>Zika</i> vírus produzidas por LIMA <i>et al.</i> (2019) . . . . .	8
2.4	Configurações de operação de filtração por membranas. Fonte: CHARCOSSET (2006). . . . .	12
2.5	Queda de fluxo de permeado ao longo da operação de filtração. Fonte: MULDER (1995) . . . . .	14
2.6	Representação do monômero da cadeia polimérica da celulose regenerada com <b>n</b> unidades de repetição. Fonte: MADAENI e HEIDARY (2011); ALELE e ULBRICHT (2016) . . . . .	16
2.7	Representação do monômero da cadeia polimérica de fluoreto de polivinilideno com <b>n</b> unidades de repetição. Fonte: SCOTT (1995) . . . . .	17
2.8	Representação do monômero da cadeia polimérica de polisulfona com <b>n</b> unidades de repetição. Fonte: GOURLEY <i>et al.</i> (1994) . . . . .	18

2.9	Representação do monômero da cadeia polimérica de poliétersulfona com <b>n</b> unidades de repetição. Fontes: GOURLEY <i>et al.</i> (1994); QI e HUANG (1998) . . . . .	18
3.1	Arranjo experimental incluindo as etapas de clarificação e concentração de sobrenadante de cultivo celular contendo as partículas pseudovirais. . . . .	24
3.2	Metodologia de ultrafiltração utilizando o dispositivo Vivaspin® 20. . . . .	25
3.3	Metodologia de ultrafiltração utilizando célula agitada Amicon® (modelo 8400). . . . .	26
3.4	Experimentos de ultrafiltração utilizando célula agitada da Amicon® (modelo 8400, Merck, EUA). . . . .	26
3.5	Representação do teste SDS-PAGE. MM: Marcador de massa molecular. . . . .	31
3.6	Representação de equipamento HPLC com detector acoplado de radiação UV. . . . .	34
4.1	Uso de sobrenadante coletados nos experimentos de ultrafiltração. <i>Detalhamento no apêndice B, item B.1.</i> . . . .	37
4.2	<i>Imunoblot</i> das frações permeadas de diferentes membranas empregadas na etapa de clarificação (revelação por fosfatase alcalina). a) Alimentação armazenada por 48 horas sob condições não estéreis; b) Alimentação armazenada sob condições estéreis; c) Membrana de nitrocelulose de 0,45 $\mu\text{m}$ ; d) Membrana de nitrocelulose de 0,80 $\mu\text{m}$ ; e) Membrana de PVDF de 0,45 $\mu\text{m}$ . . . . .	38
4.3	<i>Immunoblot</i> de frações retidas e permeadas para dispositivo Vivaspin® 20 de <i>cut-off</i> igual a 300 kDa (revelação por fosfatase alcalina). a) Fração retida; b) Fração permeada 1; c) Fração permeada 2; d) Fração permeada 3. . . . .	39

4.4	Elektroforese em gel de poliacrilamida 10% contendo frações retidas (R) e permeadas (P) da UF em PES de 300 kDa. MM: Marcador de massa molecular (Precision Plus Protein <sup>TM</sup> All Blue Standards, Bio-Rad, EUA); <i>Feed</i> : Alimentação contendo VLPs de Zika; As letras 'a', 'b' e 'c' representam as triplicatas experimentais. . . . .	40
4.5	<i>Immunoblot</i> de frações retidas e permeadas para dispositivo Vivaspin® 20 de <i>cut-off</i> igual a 1000 kDa (revelação por fosfatase alcalina). a) Fração retida; b) Fração permeada 1; c) Fração permeada 2. . . . .	42
4.6	Elektroforese em gel de poliacrilamida 10% contendo frações retidas (R) e permeadas (P) da UF de 1000 kDa. MM: Marcador de massa molecular (Precision Plus Protein <sup>TM</sup> All Blue Standards, Bio-Rad, EUA); <i>Feed</i> : Alimentação contendo VLPs de Zika. As letras 'a', 'b' e 'c' representam as triplicatas experimentais. . . . .	43
4.7	Fotografia do aparato experimental utilizado na etapa de ultrafiltração em célula agitada Amicon® (modelo 8400, Merck, EUA). . . . .	45
4.8	Fluxo de permeado para ultrafiltrações em PES (500 kDa) e RC (100 kDa) de sobrenadante de cultivo celular contendo VLPs de Zika a 2 bar. . . . .	45
4.9	<i>Immunoblot</i> para as frações alimentadas, retidas e permeadas das operações de ultrafiltração em PES (500 kDa) e RC (100 kDa) a 2 bar (revelação por peroxidase/D-HRP). <i>Feed</i> : Alimentação contendo VLPs de Zika. . . . .	47
4.10	Elektroforese em gel poliacrilamida 10% contendo frações retidas (R) e permeadas (P) da UF de 500 kDa. MM: Marcador de massa molecular (Precision Plus Protein <sup>TM</sup> All Blue Standards, Bio-Rad, EUA); <i>Feed</i> : Alimentação contendo VLPs de Zika; <i>Pool 5 - 7</i> : Mistura de mesma proporção das frações permeadas 5 a 7. . . . .	49

4.11	Elektroforese em gel poliacrilamida 10% contendo frações retidas (R) e permeadas (P) da UF de 100 kDa. MM: Marcador de massa molecular (Precision Plus Protein <sup>TM</sup> Unstained Standards, Bio-Rad, EUA); <i>Feed</i> : Alimentação contendo VLPs de Zika. Padrão de VLP: alíquota purificada de produção <i>in-house</i> de VLP de Zika. . . . .	50
4.12	Permeabilidade hidráulica calculada para membrana de PES de 500 kDa em função de seu reuso. . . . .	52
4.13	Fluxo de permeado para as ultrafiltrações de sobrenadante de cultivo celular contendo VLPs de Zika em membrana de PES (500 kDa) a diferentes pressões de operação: 2 bar e 1,5 bar. . . . .	53
4.14	Ensaio de <i>Dot Blot</i> para frações das ultrafiltrações em PES de 500 kDa a diferentes $\Delta P$ : 2 bar e 1,5 bar (revelação por peroxidase/D-HRP). <i>Feed</i> : Alimentação contendo VLPs de Zika vírus. . . . .	54
4.15	Fatores de rejeição a proteínas de envelope de Zika calculados para membrana de PES de 500 kDa a diferentes pressões de operação. . . . .	56
4.16	<i>Western blot</i> a partir de gel de poliacrilamida 10% contendo frações retidas (R) e permeadas (P) da UF em PES de 500 kDa ( $\Delta P = 2$ bar e 1,5 bar) (revelação por peroxidase/D-HRP). MM: Marcador de massa molecular (Precision Plus Protein <sup>TM</sup> Dual Color Standards, Bio-Rad, EUA); <i>Feed</i> : Alimentação contendo VLPs de Zika; Retido*: massa de proteínas totais igual a contida na coluna de <i>Feed</i> ; <i>Pool</i> : Mistura de mesma proporção das frações permeadas descritas. Para ambas figuras, houve a sobreposição das imagens colorimétricas e de quimiluminescência por programa de edição gráfica. . . . .	57
4.17	Cromatogramas das frações da ultrafiltração em PES de 500 kDa a 2 bar: alimentação, fração retida, frações permeadas e padrão de VLP de Zika vírus (produção <i>in-house</i> ). . . . .	58

4.18	Cromatogramas das frações da ultrafiltração em PES de 500 kDa a 1,5 bar: alimentação, fração retida, frações permeadas, padrão de VLP de Zika vírus (produção <i>in-house</i> ) e padrão comercial de proteína de envelope monomérica do vírus Zika (Native Antigen Company, Reino Unido).	59
4.19	Cromatogramas, com ênfase no tempo de retenção das VLPs de Zika, das frações da ultrafiltração em PES de 500 kDa injetadas em sistema HPLC/SEC-UV. . . . .	61
4.20	Ensaio de <i>Dot Blot</i> para frações das ultrafiltrações em PES de 500 kDa e em RC de 100 kDa a 1,5 bar. . . . .	64
4.21	Ensaio de <i>Western blot</i> para frações das ultrafiltrações em PES de 500 kDa e em RC de 100 kDa a 1,5 bar (revelação por peroxidase/D-HRP). MM: Marcador de massa molecular (Precision Plus Protein <sup>TM</sup> Dual Color Standards, Bio-Rad, EUA); <i>Feed</i> : Alimentação contendo VLPs de Zika; Retido*: massa de proteínas totais igual a contida na coluna de <i>Feed</i> ; <i>Pool</i> : Mistura de mesma proporção das frações permeadas descritas. Para ambas figuras, houve a sobreposição das imagens colorimétricas e de quimiluminescência por programa de edição gráfica. . . . .	66
4.22	Cromatogramas das frações da ultrafiltração em PES de 500 kDa a 1,5 bar injetadas em sistema HPLC/SEC-UV: alimentação, fração retida, frações permeadas e padrão de VLP de Zika (produção <i>in-house</i> ). . . . .	67
4.23	Cromatogramas das frações da ultrafiltração em RC de 100 kDa a 1,5 bar injetadas em sistema HPLC/SEC-UV: alimentação, fração retida, frações permeadas e padrão de VLP de Zika (produção <i>in-house</i> ). . . . .	68
4.24	Cromatogramas, com ênfase no tempo de retenção das VLPs de Zika, das frações da ultrafiltração a 1,5 bar em PES de 500 kDa e RC de 100 kDa injetadas em sistema HPLC/SEC-UV. . . . .	69
A.1	Digitalização da mensagem expressa no site de origem da imagem 'Figura 2.1: Representação da estrutura do vírus Zika'. . . . .	87

# Lista de Tabelas

3.1	Características das membranas e da célula agitada de ultrafiltração da Amicon® (modelo 8400, Merck, EUA). . . . .	27
4.1	Especificações do cultivo celular da linhagem HEK293 - 3F6/LECC9 para produção de VLPs de Zika vírus. . . . .	36
4.2	Resultados de desempenho das ultrafiltrações em PES de 500 kDa e RC de 100 kDa. . . . .	46
4.3	Concentrações de proteínas totais para frações recolhidas em ultrafiltrações ( $\Delta P = 2$ bar) em PES de 500 kDa e em RC de 100 kDa, em triplicata analítica. (Ajuste linear: $R^2 = 0,98173^*$ , $p < 0,05$ ). Valores amostrais dados no Apêndice B.2. . . . .	47
4.4	Permeabilidades hidráulicas calculadas para a membrana de poliétersulfona de 500 kDa em função de seus reusos. (Ajustes lineares: $R_{Nova}^2 = 0,96252$ , $R_{1x}^2 = 0,99348^*$ , $R_{2x}^2 = 0,99938^*$ ; $p < 0,05$ ). . . . .	52
4.5	Resultados de desempenho das ultrafiltrações em PES de 500 kDa ( $\Delta P = 2$ bar e $\Delta P = 1,5$ bar). . . . .	53
4.6	Concentrações de proteínas totais para frações recolhidas em ultrafiltrações em PES de 500 kDa ( $\Delta P = 2$ bar e $1,5$ bar), em triplicata analítica. (Ajuste linear $_{\Delta P=2bar}$ : $R^2 = 0,97695^*$ , $p < 0,05$ ; Ajuste linear $_{\Delta P=1,5bar}$ : $R^2 = 0,99164^*$ , $p < 0,05$ ). Valores amostrais dados no Apêndice B.3. . . . .	55



4.7	Concentrações de proteínas de envelope de Zika para frações recolhidas em ultrafiltrações em PES de 500 kDa ( $\Delta P = 2$ bar e 1,5 bar), em triplicata analítica. (Ajuste linear: $R^2 = 0,98842^*$ , $p < 0,05$ ). Valores amostrais dados no Apêndice B.4. . . . .	55
4.8	Resultados de desempenho das ultrafiltrações em PES de 500 kDa e em RC de 100 kDa a 1,5 bar. . . . .	63
4.9	Concentrações de proteínas totais para frações recolhidas em ultrafiltrações em PES de 500 kDa e RC de 100 kDa a 1,5 bar, em triplicata analítica. (Ajuste linear <sub>PES</sub> : $R^2 = 0,99164^*$ , $p < 0,05$ ; Ajuste linear <sub>RC</sub> : $R^2 = 0,94788^*$ , $p < 0,05$ ). Valores amostrais dados no Apêndice B.5. . . . .	64
4.10	Concentrações de proteínas de envelope de Zika para frações recolhidas em ultrafiltrações em PES de 500 kDa e RC de 100 kDa a 1,5 bar, em triplicata analítica. (Ajuste linear: $R^2 = 0,98842^*$ , $p < 0,05$ ). Valores amostrais dados no Apêndice B.6. . . . .	64
B.1	Concentrações amostrais de proteínas totais para frações recolhidas em ultrafiltrações ( $\Delta P = 2$ bar) em PES de 500 kDa e em RC de 100 kDa, em triplicata analítica. . . . .	89
B.2	Concentrações amostrais de proteínas totais para frações recolhidas em ultrafiltrações em PES de 500 kDa ( $\Delta P = 2$ bar e 1,5 bar), em triplicata analítica. . . . .	89
B.3	Concentrações de proteínas de envelope de Zika para frações recolhidas em ultrafiltrações em PES de 500 kDa ( $\Delta P = 2$ bar e 1,5 bar), em triplicata analítica. . . . .	90
B.4	Concentrações amostrais de proteínas totais para frações recolhidas em ultrafiltrações em PES de 500 kDa e RC de 100 kDa a 1,5 bar, em triplicata analítica. . . . .	91
B.5	Concentrações de proteínas de envelope de Zika para frações recolhidas em ultrafiltrações em PES de 500 kDa e RC de 100 kDa a 1,5 bar, em triplicata analítica. . . . .	92

# Lista de Símbolos

$C_{SolutoPerm}$	Concentração da proteína de interesse na fração permeada, p. 13
$C_{SolutoRet}$	Concentração da proteína de interesse na fração retida, p. 13
<i>Fouling</i>	Taxa de fouling, p. 15
$J_p$	Permeabilidade da membrana, p. 13
$J_{vAntes}$	Permeabilidade da membrana em água ultrapura anterior ao processo de separação, p. 15
$J_{vDepois}$	Permeabilidade da membrana em água ultrapura após o processo de separação, p. 15
$J_v$	Fluxo de permeado, p. 13
$R$	Coefficiente de rejeição da membrana, p. 13
$R_T$	Resistência à filtração, p. 13
$V$	Volt, p. 26
$X_{mdio}$	Média amostral, p. 24
$\Delta P$	Diferença de pressão, p. 13
$\mu_x$	Média populacional, p. 24
$s_x$	Desvio padrão amostral, p. 24
$CO_2$	Dióxido de carbono, p. 22

$\text{CO}_3^{-2}$	Íon carbonato, p. 22
$\text{HCO}_3^{-1}$	Íon bicarbonato, p. 22
HCl	Ácido clorídrico, p. 25
$\text{MgCl}_2$	Cloreto de magnésio, p. 25
N	Número de amostras, p. 24
NaCl	Cloreto de sódio, p. 25
$\text{NaN}_3$	Azida de sódio, p. 35
NaOH	Hidróxido de sódio, p. 35

# Lista de Abreviaturas

<i>Da</i>	Dalton, p. 6
$\mu$	Micro, p. 10
<i>k</i>	Quilo, p. 6
<i>m</i>	Metro, p. 6
<i>n</i>	Nano, p. 6
AeDNV	<i>Densonucleovirus</i> , p. 10
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> , p. 28
D-HRP/HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> , p. 25
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> , p. 30
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> , p. 1
GM	Gabinete do Ministro, p. 2
HAdV-2	Adenovirus humano tipo 2, p. 10
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i> , p. 23
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i> , p. 11
HPLC	<i>High performace liquid chromatography</i> , p. 29
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i> , p. 5

IgG	Imunoglobulina G, p. 25
LECC	Laboratório de Engenharia de Cultivos Celulares, p. 23
MF	Microfiltração, p. 10
MM	Massa molecular, p. 27
MS	Ministério da Saúde, p. 2
MWCO	<i>Molecular weight cut-off</i> , p. 19
NC	Nitrocelulose, p. 17
OMS	Organização Mundial da Saúde, p. 7
PES	Poliétersulfona, p. 18
PPV	Partículas pseudovirais, p. 8
PSA	Persulfato de amônio, p. 27
PS	Polisulfona, p. 11
PVDF	Fluoreto de polivinilideno, p. 17
PV	Partículas virais, p. 10
RC	Celulose regenerada, p. 17
RNA	Ácido ribonucléico, p. 5
SDS	Dodecil sulfato de sódio, p. 27
SEC	<i>Size exclusion chromatography</i> , p. 30
SUS	Sistema Único de Saúde, p. 2
TBS	<i>Tris-buffered saline</i> , p. 25
TMP	<i>Transmembrane pressure</i> , p. 52

Tris	Tris(hidroximetil)aminometano, p. 25
UF	Ultrafiltração, p. 19
VLP	<i>Virus-like particles</i> , p. 8
WB	<i>Western blot</i> , p. 28
mAb	<i>Monoclonal antibody</i> , p. 25
pI	Ponto isoelétrico, p. 62

# Capítulo 1

## Introdução

A indústria farmacêutica apresentou elevado crescimento nas últimas décadas em grande parte devido à tecnologia de DNA recombinante, desenvolvida na década 70, e dada como marco inicial da biomanufatura 3.0 que se iniciaria em 1980. Esta tecnologia tornou possível a geração de produtos biofarmacêuticos de alta complexidade e que não poderiam ser produzidos por processos químicos convencionais (KINCH, 2015; ZHANG *et al.*, 2017).

Segundo WALSH (2002), um produto biofarmacêutico é uma substância baseada em proteínas ou ácidos nucleicos para uso terapêutico ou para fins de diagnóstico *in vivo*, a qual é produzida por métodos que não a extração de uma fonte biológica nativa. Em 2017, a agência regulatória americana (FDA, *Food and Drug Administration*) aprovou 17 novos medicamentos de origem biológica, sendo 17,8 % do total de novos medicamentos aprovados (45) destinados a doenças infecciosas. Isto porque, apesar do aumento progressivo da incidência de doenças cardiovasculares, câncer e de outras doenças de origem não-infecciosa, as doenças infecciosas são muito relevantes, sendo responsáveis pela maior fração das mortes no ano de 2010 em países de baixa renda (DYE, 2014; KINCH e GRIESENAUER, 2018; LOKKO *et al.*, 2018).

Assim, conforme descrito pelo estudo de NONVIGNON *et al.* (2018), a vacinação é considerada uma metodologia profilática eficaz e de adequado custo/benefício para o controle de doenças infecciosas, sendo as partículas pseudovirais (VLPs ou PPVs) consideradas bons agentes de imunização e detecção viral. Estima-se que somente o setor de

diagnóstico *in vitro* vá representar USD 87,93 bilhões em vendas no ano de 2023. (NOAD e ROY, 2003; SMITH *et al.*, 2011; MARKETS, 2018).

O processo de produção das partículas pseudovirais compreende as etapas de *upstream* e de *downstream*. O processo *upstream* objetiva produzir as VLPs sob condições controladas e requer a utilização de biorreatores (ou frascos agitados) para o cultivo da linhagem celular estabelecida. Em contrapartida, o processo *downstream* inclui todas as etapas necessárias para separar, concentrar e purificar o produto do sobrenadante de cultivo celular.(MORAES *et al.*, 2008; JUNGBAUER, 2013; JOZALA *et al.*, 2016; LOJEWSKA *et al.*, 2016).

Atualmente, as etapas de separação e purificação de grande parte dos produtos biofarmacêuticos se baseiam em operações cromatográficas sequenciais, sendo estas de alto custo. Desta forma, a utilização de membranas, tecnologia evidenciada por sua capacidade de modularização e adequada seletividade, representa uma alternativa complementar ao processo de separação das VLPs (HANKE e OTTENS, 2014).

## 1.1 Motivação

A transição para o século XXI foi marcada pela mudança da qualidade de vida populacional, resultando na redução do número de mortes decorrentes de agentes infecciosos no mundo. Este fenômeno, no entanto, não se mostrou homogêneo, sendo países de baixa renda ainda muito suscetíveis a doenças infecciosas. Não obstante, em países emergentes, os investimentos e aprovações de produtos biofarmacêuticos são inferiores aos valores observados globalmente, sendo o Brasil dependente do mercado externo para o fornecimento de produtos biológicos de uso terapêutico, centralizados pelo Ministério da Saúde e distribuídos à população pelo Sistema Único de Saúde (SUS) (decreto GM/MS nº 2.981 de 26 de Novembro de 2009) (DA SILVA MADEIRA *et al.*, 2012; DYE, 2014).

Assim, torna-se necessário o aprimoramento contínuo de tecnologias para a redução de custos de produção de vacinas e de métodos de detecção viral, visando reduzir a dependência do mercado brasileiro e suprir a demanda do mercado externo (CHUAN *et al.*, 2014; DYE, 2014).



## **1.2 Objetivos**

Este trabalho objetivou avaliar a operação de ultrafiltração para separar as partículas pseudovirais de Zika vírus contidas em sobrenadante de cultivo celular produzido no Laboratório de Engenharia de Cultivos Celulares da COPPE/UFRJ.

### **1.2.1 Objetivos específicos**

Os objetivos específicos do presente trabalho foram:

- Selecionar membranas de diferentes cortes nominais de massa molecular para separar partículas pseudovirais de Zika contidas em sobrenadante de cultivo celular;
- Avaliar o desempenho das membranas na operação de ultrafiltração;
- Investigar o efeito das condições de operação sobre o fluxo de permeado e na rejeição da membrana.

# Capítulo 2

## Revisão Bibliográfica

Neste capítulo serão abordados conceitos fundamentais referentes à virologia para a correta contextualização das partículas pseudovirais. Adicionalmente, o processo de *downstream* de produtos biofarmacêuticos será descrito em termos de qualidade e desenvolvimento de novos produtos. Por fim, haverá a revisão da literatura acerca da tecnologia de membranas, sendo, de forma sucinta, os materiais poliméricos comumente utilizados na manufatura das membranas também descritos.

### 2.1 Os vírus e as vacinas virais

Os vírus são patógenos sem capacidade de replicação autônoma, sendo sua estrutura influenciada pelas condições físico-químicas do meio, tais como pH e temperatura. Os efeitos observados devidos à infecção viral são descritos como 'patogênese viral', quando a nível de organismo, e como 'efeito citopático', quando a nível celular. A infecção celular pode ser dividida em 8 etapas (NAYAK, 2000; HIETPAS *et al.*, 2005; WILUSZ, 2005; JAN e TAO, 2015):

1. Adsorção.
2. Penetração.
3. Desnudamento.

4. Migração do material genético viral para a região de replicação e transcrição primária dos genes virais.
5. Replicação viral.
6. Transcrição secundária dos genes virais.
7. Empacotamento do genoma viral.
8. Liberação das partículas virais.

Dessa forma, a prevenção da etapa de adsorção das proteínas da partícula viral aos receptores celulares, decorrente da ação de anticorpos neutralizantes gerados pelo sistema imune, permite a interrupção do processo de infecção. Estes anticorpos neutralizantes estão presentes quando, por exemplo, o organismo foi previamente imunizado com uma vacina para o vírus em questão (WILUSZ, 2005).

Segundo o *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) em seu relatório divulgado em 12 de Março de 2018, há 4853 espécies virais identificadas. Dentre estas, os Flavivírus compreendem pouco mais que 70 espécies virais, sendo muitas destas transmitidas por artrópodes (MANSFIELD e KING, 1998; ICTV, 2018).

### **2.1.1 Família *Flaviviridae***

A família *Flaviviridae* possui como material genético uma fita simples com senso positivo de RNA e possui ciclo exclusivamente citoplasmático em mamíferos. Sua partícula viral madura conta com três proteínas estruturais: a estrutura central (*core* ou capsídeo, C), disposta no formato de um icosaedro, e que possui em seu interior o material genético; uma estrutura oligomérica altamente complexa, o envelope (E), e uma membrana glicoproteica (M). A proteína de membrana, no entanto, é oriunda de uma estrutura intermediária denominada de pré-membrana (pr-M), sendo esta clivada pela ação da enzima furina em meio ácido no processo de maturação da partícula viral (STEPHENSON, 1988; WILUSZ, 2005; LI *et al.*, 2008).

Paralelamente, o processo de maturação viral também age na conformação estrutural da proteína de envelope. Dividida em três domínios, a proteína de envelope possui, na

extremidade de seu domínio II (E-DII), um *loop* de fusão que, sob condições acidificantes (geradas no processo de maturação da partícula viral), sofre alteração conformacional e se torna disponível para se inserir na parte externa da membrana celular da célula alvo. Dessa forma, na resposta imune a flavivírus, a proteína de envelope é responsável pela maior parte dos anticorpos neutralizantes gerados, sendo estes capazes de impedir a adsorção da partícula viral e, conseqüentemente, a liberação do material genético na célula hospedeira (HEINZ e STIASNY, 2012; PIERSON e KIELIAN, 2013).

Segundo NAYAK (2000), o diâmetro médio da partícula dos flavivírus se situa entre 40 e 50 nm. Sua estrutura está representada na Figura 2.1, onde é mostrada a representação da partícula madura do vírus *Zika* com 90 cópias de dímeros da proteína E (com massa molecular igual a 50 kDa) e 180 cópias de M (de massa molecular aproximada de 25 kDa) (LI *et al.*, 2008; CHONG *et al.*, 2014; BOIGARD *et al.*, 2017; LIN *et al.*, 2018).

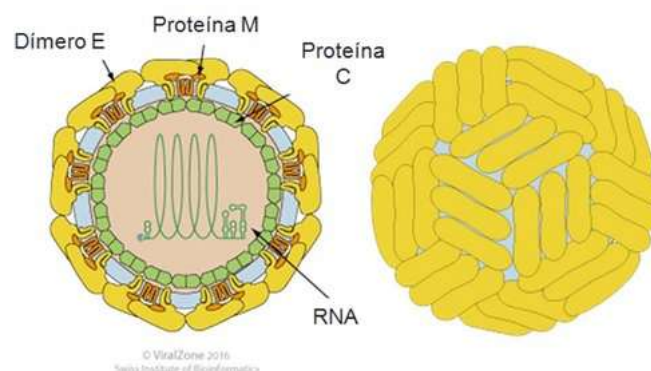


Figura 2.1: Representação da estrutura do vírus *Zika*. Fonte: Adaptado de VIRAL-ZONE/EXPASY (2016).

## Vírus Zika

Pertencente à família *Flaviviridae*, gênero dos *Flavivirus*, o vírus *Zika* apresentou disseminação extremamente rápida entre os anos de 2015 - 2016, o que levou a Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Organização Pan-americana de Saúde a decretarem estado de alerta. Em outubro de 2016, 67 países relataram casos de transmissão local do vírus *Zika*, sendo que 27 países relataram casos de abnormalidades cerebrais congênitas e diversos países relataram também a síndrome de Guillain-Barré relacionada a este vírus

(KRAUER *et al.*, 2017).

O vírus Zika foi primeiramente isolado em 1947 de macacos *Rhesus* em Uganda, sendo os primeiros casos de contaminação humana reportados em 1952 na República da Tanzânia e Uganda. Comumente transmitido pela picada de mosquito do gênero *Aedes* infectado (*Aedes aegypti* em países tropicais/sub-tropicais e *Aedes albopictus* em regiões temperadas), análises filogenéticas identificaram duas linhagens principais circulantes (africana e asiática), sendo sua expansão dada na Figura 2.2 (GALÁN-HUERTA *et al.*, 2016; ZANLUCA e DOS SANTOS, 2016).

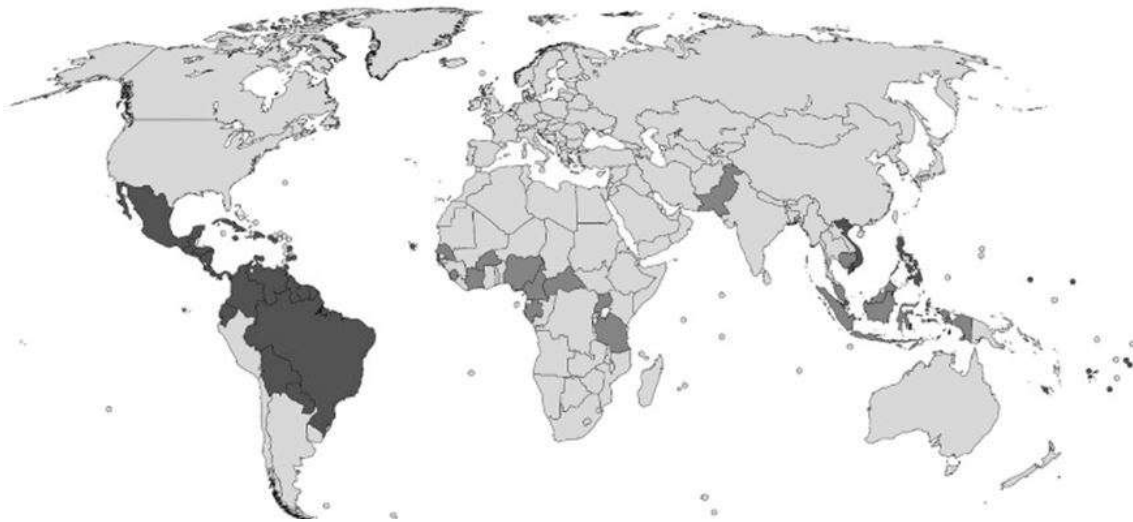


Figura 2.2: Distribuição de transmissões do vírus Zika - (Cinza): Países com transmissão de vírus Zika anterior ao surto dos Estados Federados da Micronésia em 2017. (Preto): Países com transmissão autóctone de vírus Zika. Fonte: Adaptado de BASILE *et al.* (2017) *apud* BOGOCH *et al.* (2016); HENNESSEY *et al.* (2016); MAURER-STROH *et al.* (2016); YAKOB e WALKER (2016).

No Brasil, a primeira identificação do vírus Zika se deu em maio de 2015, sendo a cepa viral circulante 99 % semelhante à linhagem isolada na Polinésia Francesa. Apesar dos esforços de controle do mosquito transmissor, a propagação do vírus ainda ocorre em território nacional e a abrangência desta não pode ser determinada devido à falta de ferramentas adequadas de diagnóstico. Segundo pesquisa realizada em 2018, ainda não foram aprovadas vacinas para o vírus *Zika*, sendo o desenvolvimento de medidas profiláticas crucial, portanto, para o combate do vírus ao redor do mundo (RIBEIRO *et al.*, 2016; BASU *et al.*, 2018; POLAND *et al.*, 2018).

## 2.1.2 Partículas pseudovirais

As partículas pseudovirais (PPVs ou VLPs) são complexos tridimensionais de proteínas recombinantes que apresentam antígenos<sup>1</sup> virais em sua superfície e não possuem, no entanto, a carga genética viral. Por mimetizarem a estrutura 3D do vírus nativo, não possuem o material genético e não se replicam, as VLPs representam uma alternativa mais segura para o desenvolvimento de vacinas em relação às vacinas de vírus inteiro. Uma micrografia eletrônica de transmissão de VLPs de Zika vírus produzidas no LECC/COPPE/UFRJ é mostrada na Figura 2.3 (LUDWIG e WAGNER, 2007; MORAES *et al.*, 2008; RODRÍGUEZ-LIMAS *et al.*, 2013).

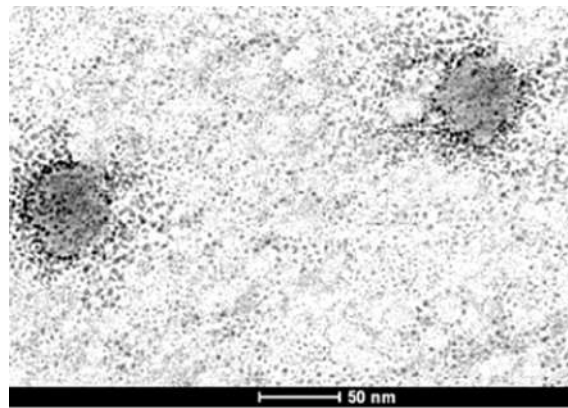


Figura 2.3: Micrografia eletrônica de transmissão de VLPs de Zika vírus produzidas por LIMA *et al.* (2019)

Apesar das partículas pseudovirais serem altamente imunogênicas, a resposta imunológica depende de diversos fatores e pode ser função do tipo de partícula pseudoviral. Segundo FUENMAYOR *et al.* (2017), as VLPs podem conter uma camada externa lipídica no envelope, radicais de hemaglutinina expostos na superfície (conforme descritos para as VLPs de influenza) e podem ser do tipo quimérica, contendo proteínas advindas de mais de uma cepa viral. Estas características singulares de cada tipo de VLP requerem, pois, plataformas de produção específicas, sendo os cultivos de células de bactérias, leveduras, células de insetos, células vegetais e de mamíferos comumente investigados para a

<sup>1</sup> Antígeno é qualquer substância que se liga especificamente a um anticorpo ou receptor de célula T, sendo apenas parte de sua estrutura (epítipo) ligada diretamente ao anticorpo. Essas macromoléculas que estimulam as respostas imunes são denominadas de imunógenos (ABBAS *et al.*, 2015).

produção destas partículas recombinantes (NOAD e ROY, 2003; FRIETZE *et al.*, 2016).

## **2.2 Processo *downstream* de produtos biofarmacêuticos**

O processo *upstream* tem grande impacto no perfil de impurezas que devem ser posteriormente removidas ao longo do processo de *downstream*. Divididas em duas categorias, as impurezas críticas podem ser classificadas em contaminantes críticos derivados do processo ou derivados do produto. Para a remoção de impurezas, alguns aspectos devem ser levados em consideração nos processos de separação e purificação, tais como remover primeiramente as impurezas presentes em maior quantidade, explorar as diferenças físico-químicas do produto de interesse e dos demais componentes da mistura bem como deixar a operação de maior custo no fim da linha de processamento. Não obstante, a seleção dos fatores preponderantes (custo, pureza e capacidade de purificação) dependem da finalidade da proteína desejada (MORAES *et al.*, 2008; LI e QIU, 2013).

Diversas propriedades devem ser monitoradas ao longo do processamento *downstream* de produtos biofarmacêuticos, onde se destacam a massa molecular do produto, sua estrutura primária (bem como secundária e terciária), o perfil de glicosilação e a atividade biológica (PARR *et al.*, 2016).

As tecnologias aplicadas nos processos de separação e purificação destes produtos, no entanto, estão em constante desenvolvimento. Operações onerosas, tais como a cromatografia líquida, aplicadas nas etapas de captura e polimento, são investigadas em conjunto com operações já consolidadas em demais indústrias químicas para a redução de custos. Estas operações, de reduzida resolução, são aplicadas na etapa de clarificação e separação, onde se destacam a microfiltração, ultrafiltração e centrifugação (GOTTSCHALK, 2011).

### **Etapas de separação e concentração utilizando membranas**

A tecnologia de membranas é amplamente aplicada em diversos estágios no processo de *downstream*, sendo o desenvolvimento de novos materiais de membranas e o melhor

entendimento do fenômeno de *fouling* aspectos que permitirão obter separações de alta eficiência, capacidade e de baixas tendências a incrustações (CRAMER e HOLSTEIN, 2011).

Esta tecnologia, na manufatura de proteínas recombinantes, dá-se principalmente através das operações de microfiltração (MF) e ultrafiltração (UF). Nos processos de microfiltração, as membranas usualmente possuem poros na faixa de 0,1 a 10  $\mu\text{m}$  e são isotrópicas; enquanto as membranas de ultrafiltração detêm poros na faixa de 1 a 100 nm e são anisotrópicas. Dessa forma, a microfiltração é comumente utilizada para a remoção de células e debris celulares do meio de cultivo, enquanto a ultrafiltração é utilizada para a concentração e troca de tampão (diafiltração) (HABERT *et al.*, 2006; JUNGBAUER, 2013).

Diversos trabalhos na literatura reportam o uso de membranas em processos que fazem uso de vetores virais ou que se baseiam na produção de partículas virais (PV). Em trabalho realizado por GRZENIA *et al.* (2008), realizou-se a separação do vírus *densonucleovirus* (AeDNV) contido em sobrenadante de cultivo celular empregando membranas de poliétersulfona (300 kDa, 100 kDa, 50 kDa e 30 kDa), sob a premissa de concentrar as partículas virais concomitantemente à remoção de impurezas tais como as proteínas das células hospedeiras e DNA. Os resultados descreveram permeação parcial de partículas virais para a membrana de 300 kDa, enquanto valores abaixo do limite de detecção foram obtidos para as frações permeadas das demais membranas.

A eficiência de separação de partículas virais por membranas, contudo, está em função de distintos fatores, sendo a interação físico-química entre as VPs e a superfície da membrana, descrita por LU *et al.* (2017), como um importante aspecto no desempenho da operação. A partir de seu estudo empregando membrana funcionalizada de poliétersulfona de 150 kDa na retenção de bacteriófago MS2 e adenovírus humano tipo 2 (HAdV-2), determinou-se o aumento da capacidade de retenção das partículas virais a partir de modificações estruturais da membrana que ocasionaram aumento de seu caráter hidrofílico.

Portanto, com os adventos da expressão de partículas pseudovirais, a tecnologia de separação por membrana foi aplicada em seu processo de produção. Segundo trabalho



conduzido por NEGRETE *et al.* (2014), partículas pseudovirais envelopadas do vírus HIV, de diâmetro de aproximadamente 120 nm, foram separadas e concentradas a partir da otimização de sistema empregando duas etapas com membranas de fibras ocas: microfiltração, para clarificação do sobrenadante de cultivo celular, utilizando membrana de polisulfona (PS) de 0,45  $\mu\text{m}$ , e ultrafiltração com membrana de polisulfona de 500 kDa.

### **Etapa de captura e polimento**

A cromatografia líquida ainda se mantém como a tecnologia de maior aplicação pela indústria farmacêutica nas etapas de purificação, sendo seus avanços expressos pela determinação das melhores condições de eluição e desenvolvimento das fases estacionárias (CRAMER e HOLSTEIN, 2011).

De acordo com o trabalho conduzido por MUNDLE *et al.* (2015), fora possível purificar partículas virais pseudoinfecciosas de *West Nile* (vírus pertencente ao gênero dos flavivírus) empregando ultrafiltração tangencial, com fibras ocas de polisulfona de 100 kDa e 500 kDa (80% de recuperação, para ambas membranas), e cromatografia líquida com monolito de troca aniônica (CIM® Q).

## **2.3 Tecnologia de separação por membranas**

A membrana é definida como uma barreira semi-permeável que age seletivamente na retenção ou permeação de partículas ou moléculas, sendo a condição de transporte do fluido determinada pela força motriz da operação que, na maioria dos casos, é representada pela diferença de pressão (membrana porosa) ou diferença de concentração (membrana densa) entre as fases retida e permeada (SINGH, 2014).

O processo de separação por membranas possui como vantagem a utilização de condições brandas de pressão e temperatura, sendo compatível com bioprocessos. Complementarmente, é permitido estabelecer condições de alta seletividade, controlar a área de contato entre as duas fases (retida e permeada) bem como obter elevadas razões de área por volume de membrana. Os processos podem ser realizados sob duas distintas configu-

rações, conforme ilustrado na Figura 2.4 (CHARCOSSET, 2006):

- Filtração convencional (*dead-end*): nesta condição, o fluxo de alimentação se dá perpendicularmente à membrana porosa.
- Filtração tangencial: o fluxo de alimentação se dá paralelamente à membrana, o que permite a redução da concentração de materiais retidos/sedimentados na superfície da membrana e, como consequência, da redução dos efeitos das incrustações (*fouling*).

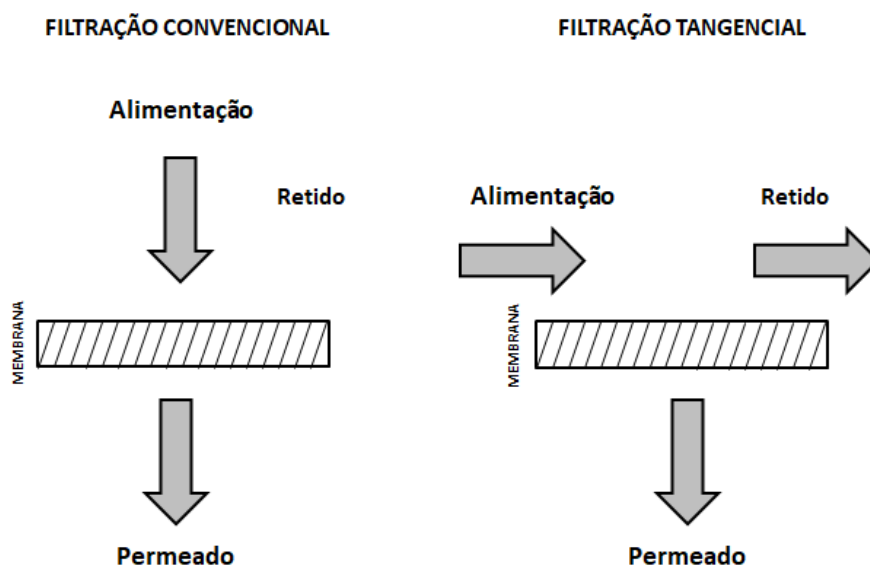


Figura 2.4: Configurações de operação de filtração por membranas. Fonte: CHARCOSSET (2006).

A eficiência de separação de membranas é função de suas características físico-químicas e do material a ser processado, sendo a operação caracterizada pelo fluxo de permeado e pelo conceito de rejeição ( $R$ ). A Equação 2.1, através das concentrações conhecidas do soluto de interesse na fração retida ( $C_{SolutRet}$ ) e na fração permeada ( $C_{SolutPerm}$ ), torna possível ao operador avaliar a eficiência de retenção do soluto. No entanto, esta capacidade de retenção do soluto alvo deve ser contra-balanceada com a capacidade de concentração das impurezas pelo sistema (MEHTA e ZYDNEY, 2005; SINGH, 2014).

$$R = \left( 1 - \frac{C_{SolutPerm}}{C_{SolutRet}} \right) \times 100 \quad (2.1)$$

### 2.3.1 Filtração convencional e fenômenos de transporte associados

A filtração convencional, comumente referida como filtração *dead-end*, baseia-se na aplicação do fluxo de alimentação perpendicularmente à superfície da membrana. Esta condição ocasiona problemas recorrentes com incrustações (*fouling*) e rápidas reduções do fluxo de permeado, que é restabelecido pela limpeza do sistema (CHEREMISINOFF, 2002).

As operações de separação por membranas que possuem a diferença de pressão como força motriz se caracterizam por um fluxo de permeado ( $J_v$ ) inicialmente proporcional à diferença de pressão ( $\Delta P$ ) entre as interfaces da membrana. Esta propriedade é expressa pela Equação 2.2, onde se introduz o termo de permeabilidade de membrana ( $J_p$ ). Não obstante, o inverso do valor desta propriedade (Equação 2.3) representa a resistência da operação ( $R_T$ ) (HABERT *et al.*, 2006).

$$J_v = J_p \times \Delta P \quad (2.2)$$

$$R_T = \frac{1}{J_p} \quad (2.3)$$

Ao longo do processo de separação, o fluxo de permeado da filtração tende a cair com o aumento do tempo de operação, conforme evidenciado na Figura 2.5, descrevendo um modelo exponencial (conforme estudo conduzido por LIN *et al.* (2008)). Ao agir seletivamente na permeação de partículas, as membranas tendem a gerar uma região em sua superfície contendo as moléculas retidas, estando estas em maiores concentrações em relação ao *bulk*. Este fenômeno, conhecido como polarização por concentração, gera resistência adicional ao processo de separação pelas limitações ocasionadas na transferência de massa (MULDER, 1995).

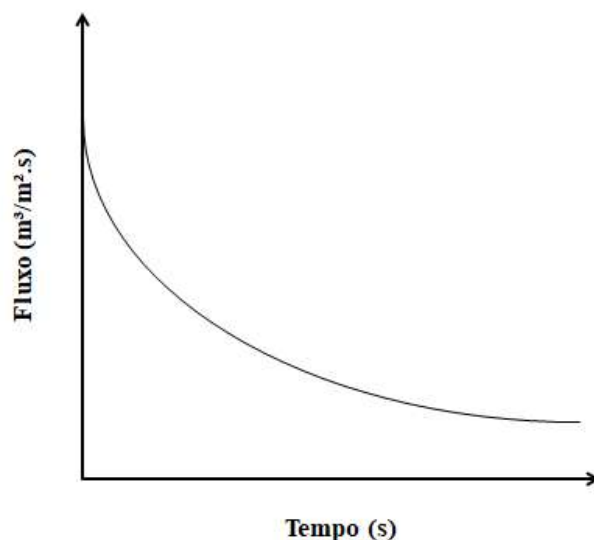


Figura 2.5: Queda de fluxo de permeado ao longo da operação de filtração. Fonte: MULDER (1995)

### **Polarização por concentração e resistências ao transporte**

Segundo MULDER (1995), a queda de fluxo ao longo da operação de filtração se dá pelas condições gerais do processo, tais como as características do meio filtrante e da membrana e as configurações da operação. Estas ocasionam não apenas a polarização por concentração mas também a adsorção, a formação de uma camada gel depositada sobre a superfície da membrana e o entupimento de poros. Estes fenômenos podem ocasionar, de forma irreversível, o *fouling* da membrana.

- Adsorção: A ocorrência de adsorção à membrana decorre das propriedades físico-químicas dos solutos, do solvente (tais como condutividade e pH) e dos componentes da membrana, que permitem interações (hidrofílicas, hidrofóbicas ou mesmo de troca iônica) com a superfície da membrana (MULDER, 1995).

Em estudo conduzido por NAKAMURA *et al.* (1989), foi observada adsorção de proteínas à membrana de nitrocelulose e se determinou capacidade de adsorção de aproximadamente  $56,6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  de Concanavalina A, proteína de massa molecular igual a 50 kDa e pI igual a 5,5, não sendo constatada dependência significativa da adsorção ao pH.

- Camada gel depositada: A formação da camada gel sobre a superfície da membrana é dada a partir da polarização por concentração e da deposição de solutos. Conforme descrito anteriormente, a polarização por concentração se dá pela diferença de concentração entre os solutos na superfície da membrana e no *bulk* da solução. Esta diferença de concentração implica em resistência adicional ao processo de separação devido a limitações na transferência de massa (difusão das moléculas da superfície da membrana para o seio da solução) (MULDER, 1995).  
No entanto, a partir da formação da camada gel, uma nova resistência é inserida no processo de separação, dada pela necessidade da difusão dos solutos pela fina camada gel disposta na superfície da membrana. Esta condição faz com que o fluxo de permeado se torne independente do aumento de pressão do sistema, tendo em vista o estabelecimento de um valor máximo de fluxo e predominância do transporte difusivo em relação ao convectivo (MULDER, 1995; BAKER, 2004).
- Entupimento de poros: Em membranas porosas, o transporte convectivo de partículas pode ocasionar o entupimento dos poros e gerar uma resistência adicional ao transporte, bem como reduzir seu diâmetro efetivo de poro (MULDER, 1995).

### ***Fouling* e implicações no processo**

O fenômeno de *fouling* é caracterizado pela sedimentação irreversível de partículas na superfície e/ou internamente na membrana, que ocasiona redução gradativa de fluxo de permeado ao longo da operação de separação. Desta forma, a Equação 2.4 permite a estimativa da tendência ao *fouling* através da medição da permeabilidade da membrana com água ultrapura anteriormente ( $J_{vAntes}$ ) e posteriormente ( $J_{vDepois}$ ) ao processo de separação (MULDER, 1995; MÄNTTÄRI *et al.*, 2006).

$$Fouling = \left( 1 - \frac{J_{vDepois}}{J_{vAntes}} \right) \times 100 \quad (2.4)$$

Devido aos efeitos indesejados do *fouling* ao processo, algumas metodologias são aplicadas para a redução destes, onde se destacam o pré-tratamento do material a ser

filtrado, melhoria dos materiais empregados na síntese da membrana, melhoria das condições de operação e limpeza da membrana (MULDER, 1995).

No que concerne às características físico-químicas da membrana, a escolha de seu material para os processos de microfiltração e ultrafiltração é função das características da operação, estabilidade térmica e estabilidade química do polímero que a compõe; bem como a interação com os solutos presentes na corrente a ser tratada (HUISMAN *et al.*, 2000; SINGH, 2014).

### 2.3.2 Materiais poliméricos

Os polímeros são cadeias de alta massa molecular geralmente interligadas por ligações covalentes, sendo suas cadeias secundárias ou moléculas próximas atraídas por forças de Van der Waals. Diversos polímeros são utilizados na fabricação de membranas, destacando-se a celulose regenerada, o fluoreto de polivinilideno, a nitrocelulose, a poli-sulfona e a poliétersulfona (RODRIGUEZ *et al.*, 2014).

#### Derivados da celulose: Celulose regenerada (RC) e Nitrocelulose (NC)

Tendo em vista a necessidade de soluções sustentáveis e de redução da dependência de fontes não-renováveis no século XXI, a celulose regenerada (Figura 2.6) e a nitrocelulose, geradas a partir da celulose (polímero natural de elevada abundância e satisfatório custo-benefício), apresentaram-se como soluções eficazes para a indústria (JIANG *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2016).

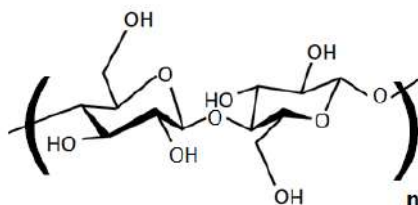


Figura 2.6: Representação do monômero da cadeia polimérica da celulose regenerada com  $n$  unidades de repetição. Fonte: MADAENI e HEIDARY (2011); ALELE e ULBRICHT (2016)

A celulose regenerada se caracteriza por sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, estabilidade térmica e química, sendo produzida a partir do processo de dissolução física, moldagem e regeneração (WANG *et al.*, 2016).

### **Fluoreto de polivinilideno (PVDF)**

A membrana de fluoreto de polivinilideno possui caráter hidrofóbico, alta estabilidade química e física, sendo, comumente, aplicada na operação de microfiltração. Tendo em vista sua natureza polimérica, seu monômero é expresso na Figura 2.7 (SCOTT, 1995; JI *et al.*, 2015).

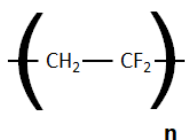


Figura 2.7: Representação do monômero da cadeia polimérica de fluoreto de polivinilideno com **n** unidades de repetição. Fonte: SCOTT (1995)

Devido à sua estabilidade frente a diversos solventes, seu caráter hidrofóbico e resistência térmica, sua aplicação na indústria biotecnológica tem se dado na imobilização de biomoléculas e em processos de separação (JI *et al.*, 2015).

### **Polisulfona (PS)**

A polisulfona é um termoplástico de alta resistência físico-química. Devido à sua resistência a soluções oxidantes e sua alta resistência mecânica, é muito utilizada na síntese de membranas poliméricas. A estrutura química de seu monômero é dada, na Figura 2.8 (HUANG e YANG, 2006).

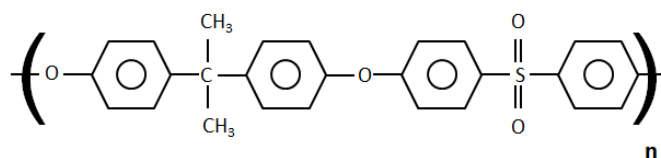


Figura 2.8: Representação do monômero da cadeia polimérica de polisulfona com **n** unidades de repetição. Fonte: GOURLEY *et al.* (1994)

Dentre suas propriedades, destaca-se seu caráter hidrofílico, sendo esta característica, no entanto, inferior ao observado para a membrana de poliétersulfona. Isto porque, segundo GOURLEY *et al.* (1994), a alta presença de energia superficial negativa decorrente dos radicais  $\text{SO}_2$  na estrutura química da poliétersulfona lhe confere mais hidroflicidade.

### Poliétersulfona (PES)

A poliétersulfona é um termoplástico aromático de elevada resistência química e física, o qual apresenta, portanto, alta estabilidade, resistência à oxidação e à hidrólise. Sua unidade de repetição é mostrada na Figura 2.9 (QI e HUANG, 1998).

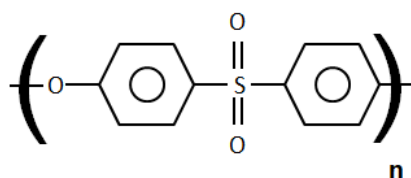


Figura 2.9: Representação do monômero da cadeia polimérica de poliétersulfona com **n** unidades de repetição. Fontes: GOURLEY *et al.* (1994); QI e HUANG (1998)

Segundo estudo conduzido por ALELE e ULBRICHT (2016), as membranas de poliétersulfona e de celulose regenerada (ambas de 100 kDa) possuem caráter hidrofílico, sendo este confirmado pela medição do potencial zeta e pela medição dos ângulos de contato. Determinou-se, através dos ângulos de contato (método estático da bolha captiva - bolha de ar), entretanto, que a membrana de celulose regenerada possui maior caráter hidrofílico (carga superficial mais negativa) que a membrana de PES. Contudo, avaliações conduzidas pelo potencial zeta demonstraram que a membrana de poliétersulfona se torna mais hidrofílica que a membrana de RC em valores de pH superiores a 6.



Este comportamento hidrofílico da membrana de PES também foi documentado por SUSANTO *et al.* (2007), onde a polarização de concentração e redução significativa de fluxo de permeado foram constatadas para a membrana de PES em experimentos conduzidos com soluções de dextrana (1 g/L) e mioglobina (0,1 g/L) em pH igual a 7.

### 2.3.3 Ultrafiltração

A ultrafiltração (UF) é a operação de separação onde uma membrana porosa é empregada para selecionar macromoléculas com diferentes valores de retenção nominal (*molecular weight cut-off*, MWCO) através da aplicação de uma diferença de pressão, sendo utilizada principalmente para a concentração de proteínas. Usualmente, as membranas utilizadas na ultrafiltração são anisotrópicas, sendo compostas por uma fina camada porosa suportada em uma camada mais espessa com poros de maiores diâmetros, sendo a primeira determinante da seletividade e a última responsável por conferir maior resistência mecânica à membrana (EYKAMP, 1995; BAKER, 2004).

Diversos fatores determinam o *cut-off* efetivo, tendo em vista que as interações entre a superfície da membrana e os componentes da solução, bem como as características físico-químicas da mistura, interferem na permeação das partículas. Segundo estudo conduzido por NYSTRÖM *et al.* (1998), os valores de pH e teor salino do meio podem contribuir para a retenção de proteínas devido aos efeitos do ponto isoelétrico da proteína e o de blindagem da camada elétrica de proteínas carregadas por eletrólitos dissolvidos. Adicionalmente, segundo BAKER (2004), a geometria da molécula também representa um fator importante na rejeição da membrana (EYKAMP, 1995).

A ultrafiltração é reportada em diversos trabalhos para a concentração de proteínas dissolvidas na corrente de alimentação. Em trabalho realizado por BALDASSO *et al.* (2011), investigou-se a aplicabilidade da UF na concentração de proteínas presentes em soro de leite através de membrana de poliétersulfona de 10 kDa disposta em módulo espiral com 0,28 m<sup>2</sup> de área de permeação. A partir da pressão de operação igual a 2 bar, os resultados obtidos indicaram capacidade de concentração das proteínas dissolvidas na alimentação, enquanto a permeação de lactato e cinzas (produtos indesejados) ao longo da

operação reduziram o aumento de seus teores na fração retida, descrevendo a seletividade da membrana.

Complementarmente, ROSLAN *et al.* (2018) descreveu condições ótimas de operação para a separação de hidrolisados de peixe (*Oreochromis niloticus*) através de membrana de celulose regenerada (5 kDa e 10 kDa) em célula agitada de filtração convencional. Este trabalho avaliou os efeitos da velocidade de agitação, pH, concentração salina e da pressão de operação no fluxo de permeado e na permeação de peptídeos. A partir de determinado valor de pressão, a membrana de 10 kDa apresentou fluxo de permeado independente da pressão aplicada, sendo o processo limitado por transferência de massa. Constatou-se, ainda, que a velocidade de agitação propiciou o aumento da permeação de peptídeos, supondo-se que a redução da camada depositada sob a membrana facilitaria o transporte convectivo.

Assim, as variações de desempenho da UF também são descritas para a concentração de produtos com finalidades farmacêuticas. Através do estudo realizado por EMAMI *et al.* (2018), a eficiência de concentração de polissacarídeos nativos da bactéria *Streptococcus pneumoniae* de sorotipos Pn3, Pn9V e Pn14 foi investigada a partir de três dispositivos de filtração: célula agitada, módulo de filtração tangencial e módulo de fibras ocas; sendo aplicadas membranas de poliétersulfona de 500 kDa. Constatou-se que o fenômeno de polarização de concentração impactou no coeficiente de rejeição das membranas, ocasionando valores estáveis de rejeição mesmo com o aumento do fluxo de permeado para a célula agitada, sendo este sistema detentor do menor coeficiente de transferência de massa observado (calculado a partir do modelo de filme estagnado).

### **2.3.4 Considerações finais**

De frente à importância das partículas pseudovirais na geração de vacinas e métodos de diagnóstico *in vitro*, o estudo da operação de ultrafiltração, metodologia já consolidada em outros setores industriais e com diversos avanços na manufatura de membranas, torna-se viável pela sua capacidade de modularização e alta seletividade. Assim, a ultrafiltração poderia ser aplicada na indústria biofarmacêutica como operação alternativa para

a redução de etapas de purificação e remoção de contaminantes de baixa massa molecular, permitindo que o produto gerado mantenha margens competitivas de custo.

# Capítulo 3

## Metodologia Experimental

Neste capítulo, apresentar-se-ão as metodologias empregadas desde a coleta do sobrenadante de cultivo celular à operação de ultrafiltração. Complementarmente, serão descritas as técnicas analíticas utilizadas e o tratamento estatístico realizado para as quantificações de proteínas totais e de densitometria.

### 3.1 Obtenção do sobrenadante de cultivo celular

A área de cultivo de células animais do LECC/COPPE/UFRJ forneceu os sobrenadantes de cultura de células HEK293 - 3F6 produtoras de VLPs de Zika vírus. Registraram-se a data de coleta dos sobrenadantes, assim como a viabilidade celular e a concentração de células no momento da coleta (equipamento modelo Vi-CELL XR, Cell Counter, Beckman). O cultivo celular foi realizado a partir da linhagem celular HEK293 - 3F6 (*Human Embryonic Kidney*) transfectada por lipofecção com o vetor plasmidial comercial PCI-NEO® (Promega) contendo a construção LECC9, a qual engloba os genes referentes às proteínas de pré-membrana (pr-M) e de envelope (E) do vírus Zika (cepa brasileira, BeH819966, código do GenBank: AMA1208.1). Estes cultivos, realizados em batelada e em meio HEK TF (Xell, Alemanha); contendo tampão carbonato ( $\text{CO}_3^{-2}$ )/ bicarbonato ( $\text{HCO}_3^{-1}$ ), pH = 7,1; foram mantidos em atmosfera controlada com 5 % de  $\text{CO}_2$  a 37 °C, sendo o sobrenadante coletado mantido em geladeira a 4 °C. Estas informações, bem como o sobrenadante de cultivo celular utilizado neste trabalho, foram fornecidas

pela pesquisadora Renata Guimarães Ferreira Alvim (LECC/PEQ/COPPE/UFRJ) (ALVIM *et al.*, 2019).

### **3.2 Coleta e pré-tratamento do sobrenadante de cultivo celular contendo VLPs de Zika vírus**

Neste trabalho, a primeira etapa de processamento do sobrenadante de cultivo celular (mantido em geladeira a 4 °C) foi a centrifugação a 1000 g (equipamento modelo ELMICM-7S ou modelo Eppendorf 5804R) para a remoção de possíveis debris celulares que prejudicariam operações futuras de separação. Este material, após a centrifugação, foi conduzido para a área analítica do Laboratório de Engenharia de Cultivos Celulares, onde as operações de separação e caracterização foram efetuadas.

Em seguida, foi realizado, por microfiltração, a etapa de clarificação do sobrenadante de cultivo celular. Foram comparadas membranas de nitrocelulose de 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore, Reino Unido) e de 0,80  $\mu\text{m}$  (Millipore, EUA); e de PVDF de 0,45  $\mu\text{m}$  (Whatman®, GE Healthcare, Reino Unido), com o objetivo de determinar qual(is) delas garantiria maior recuperação das VLPs de Zika no permeado clarificado. A membrana de PVDF foi avaliada com auxílio de um dispositivo acoplado a uma seringa, enquanto as de nitrocelulose foram avaliadas em sistema a vácuo acoplado a um dispositivo da Millipore® (diâmetro de 42 mm) e kitasato.

### **3.3 Ultrafiltração de sobrenadante de cultivo celular para concentração de VLPs de Zika vírus**

A ultrafiltração das partículas pseudovirais se deu a partir de sobrenadante previamente clarificado. O fluxograma experimental é mostrado na Figura 3.1.



Figura 3.1: Arranjo experimental incluindo as etapas de clarificação e concentração de sobrenadante de cultivo celular contendo as partículas pseudovirais.

### 3.3.1 Experimentos em batelada com dispositivos Vivaspin® com membranas de PES (300 kDa e 1000 kDa)

Os experimentos de ultrafiltração com dispositivos Vivaspin® 20 mL (Sartorius, Reino Unido) contendo membranas com *cut-off* de 300 kDa e 1000 kDa foram realizados em centrífuga (Eppendorf, modelo 5804R) a 3000 g, à temperatura de 23 °C com o objetivo de encontrar a faixa de retenção nominal mais adequada para realizar a separação das VLPs. Segundo informado pelo fabricante, o dispositivo Vivaspin® 20 mL conta com membrana de poliétersulfona de 6,0 cm<sup>2</sup> de área. No princípio, os dispositivos Vivaspin® foram lavados com água ultrapura antes de serem utilizados com as amostras do estudo, conforme diretrizes do fabricante.

A operação foi conduzida em bateladas de 20 minutos para a membrana de 300 kDa e 4 minutos para a membrana de 1000 kDa. Estes tempos foram definidos a partir de informações fornecidas no manual do fabricante para o fator de concentração desejado e com base em experimentos preliminares, sendo o arranjo experimental dado na Figura 3.2.

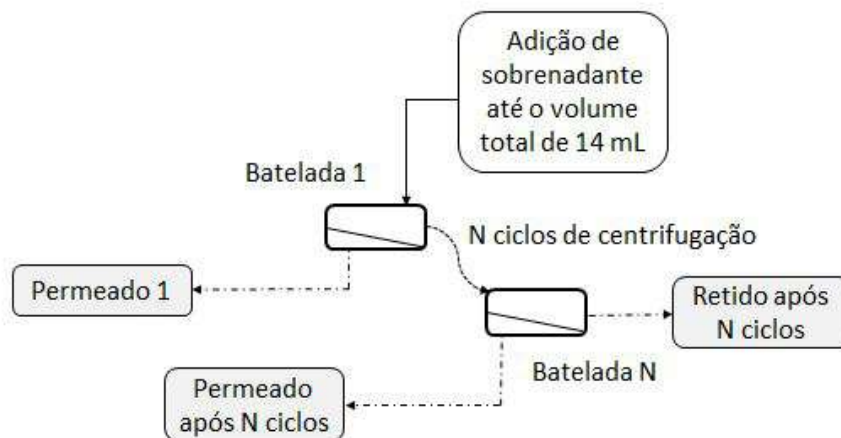


Figura 3.2: Metodologia de ultrafiltração utilizando o dispositivo Vivaspin® 20.

Houve a alimentação de 14 mL de sobrenadante em cada Vivaspin para o início da ultrafiltração. Assim, ao final de cada ciclo, as frações permeadas foram coletadas por completo e sobrenadante foi novamente alimentado, em adição ao retido do ciclo anterior, até o volume de trabalho de 14 mL. Após a obtenção de fatores de concentração volumétricos mínimos de 4 vezes, as amostras de retido e permeado foram analisadas por meio das metodologias descritas na seção 'Técnicas Analíticas'.

### 3.3.2 Utilização de célula de ultrafiltração agitada (Amicon®) contendo membranas de RC (100 kDa) e PES (500 kDa)

Os experimentos de ultrafiltração em célula agitada da Amicon® (modelo 8400, Merck, EUA) representaram um aumento de escala dos experimentos realizados anteriormente. Dessa forma, após a conclusão dos experimentos com dispositivos Vivaspin com membranas de PES e a verificação da superioridade do *cut-off* de 300 kDa em relação a 1000 kDa, utilizou-se a célula agitada Amicon® para avaliar membranas com *cut-off* em torno de 300 kDa. Em função da disponibilidade de membranas comercializadas pela Amicon, foram estudadas celulose regenerada e poliétersulfona com *cut-off* nominais iguais a, respectivamente, 100 kDa e 500 kDa. A alimentação foi de 200 mL de sobrenadante de cultivo celular clarificado, conforme a Figura 3.3.

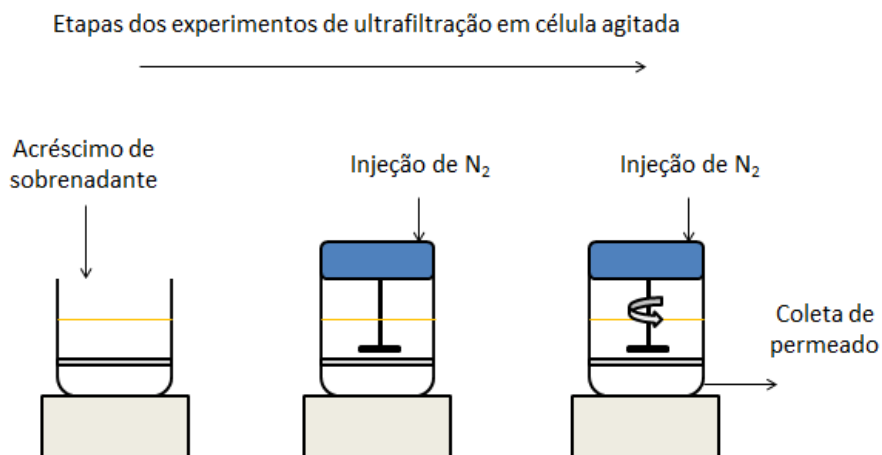


Figura 3.3: Metodologia de ultrafiltração utilizando célula agitada Amicon® (modelo 8400).

A inclusão de uma membrana de outro polímero, celulose regenerada, permitiu avaliar o efeito do material sobre o desempenho do processo e os experimentos realizados nesta etapa do estudo seguiram o esquema descrito na Figura 3.4, sendo operados sob pressurização com injeção de gás nitrogênio e agitação magnética mínima de 60 rpm (agitador modelo Corning, PC-320), para redução de possíveis efeitos de polarização por concentração e *fouling* da membrana. As características das membranas e da célula agitada Amicon são dispostas na Tabela 3.1.

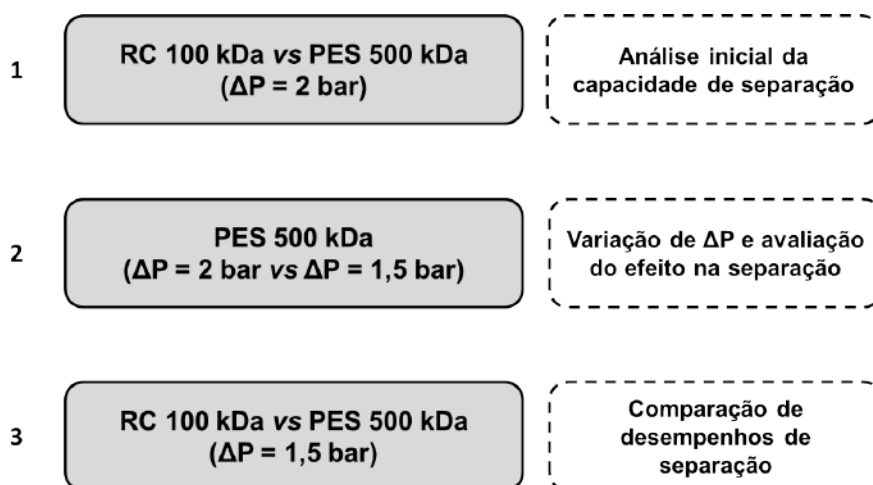


Figura 3.4: Experimentos de ultrafiltração utilizando célula agitada da Amicon® (modelo 8400, Merck, EUA).



Tabela 3.1: Características das membranas e da célula agitada de ultrafiltração da Amicon® (modelo 8400, Merck, EUA).

Item	Especificação
Capacidade máxima	400 mL
Volume morto	1,5 mL
Pressão máxima de operação	75 psi (5,17 bar)
Diâmetro de membrana	76 mm
Ultracel® 100 kDa (Amicon Bioseparations, EUA)	Celulose regenerada
Biomax® 500 kDa (Amicon Bioseparations, EUA)	Poliétersulfona

Os fluxos de permeado foram calculados a partir da coleta de alíquotas em tempos sucessivos (frações permeadas 1 a N), pesagem das mesmas (balança analítica modelo TSXT120A, Thomas Scientific) e cálculo das variações de massa (isto é, do frasco de coleta com permeado ( $Massa_{frasco+permeado}$ ) em relação ao frasco de coleta vazio ( $Massa_{frasco}$ )) por tempo, conforme descrito na Equação 3.1, onde A é a área de membrana. Assim, ao admitir a densidade da água, o fluxo mássico foi convertido para fluxo volumétrico, sendo a temperatura ambiente registrada por meio de termômetro ao longo das operações de filtração.

$$Fluxo_{permeado} = \frac{Massa_{frasco+permeado} - Massa_{frasco}}{A * Tempo} \quad (3.1)$$

De forma similar, a permeabilidade hidráulica da membrana foi determinada a partir de experimentos de ultrafiltração com água Milli-Q em sistema sem agitação e volume inicial mínimo de 200 mL, onde três diferentes pressões foram aplicadas (1,0 bar, 1,5 bar e 2,0 bar) e a permeabilidade hidráulica determinada pelo coeficiente angular do ajuste linear obtido, conforme descrito pela Equação 2.2.

A permeabilidade hidráulica calculada serviu de parâmetro para o reuso das membranas, sendo estas submetidas ao seguinte procedimento de limpeza:

1. Lavagem com água ultrapura para retirada depósitos em excesso sob a superfície da membrana.

2. Imersão em solução de Hidróxido de sódio (NaOH, 0,2 M) por 30 minutos em sistema agitado (equipamento modelo IKA®KS 130 Basic) à temperatura ambiente para a remoção de possíveis depósitos orgânicos sobre a membrana.
3. Imersão em água ultrapura sob agitação (equipamento modelo IKA®KS 130 Basic) por 20 minutos à temperatura ambiente.
4. Armazenamento em geladeira a 4 °C em solução de Azida de sódio (NaN<sub>3</sub>, 0,2 % m/v).

### 3.4 Técnicas analíticas

Diversas metodologias são investigadas na análise de produtos biofarmacêuticos e as partículas pseudovirais são geralmente caracterizadas a partir de técnicas bioquímicas e biofísicas (GROSS *et al.*, 2016; STEPPERT *et al.*, 2017).

De forma a obter dados reprodutíveis, os ajustes lineares realizados ao longo dos experimentos (admitindo-se os conjuntos amostrais x e y) foram avaliados por meio do coeficiente de correlação linear ajustado ( $R^2$ ) e do teste F, sendo este baseado na tabela *one-way* ANOVA gerada com auxílio do software Origin® e na distribuição de Fisher-Snedecor. Assim, o modelo linear foi considerado estatisticamente significativo (aferido com \*\*) ao apresentar razão F superior ao valor de F crítico (obtido pela distribuição de Fisher-Snedecor com 95 % de confiança,  $p < 0,05$ ), devido à rejeição da hipótese nula ( $H_0$ ) de que a variância dos conjuntos x e y se devesse apenas a flutuações aleatórias (BERK e BERK, 2000; SCHWAAB e PINTO, 2007).

Ao se admitir os valores de concentração de proteínas totais e VLPs obtidos, nas metodologias de Bradford e densitometria, como variáveis amostrais, realizou-se a determinação dos intervalos de confiança nos quais as médias populacionais de cada quantificação estariam inseridas, sendo este conceito expresso pela Equação 3.2 (SCHWAAB e PINTO, 2007).

$$t = \frac{X_{mdio} - \mu_x}{\frac{s_x}{\sqrt{N}}} \quad (3.2)$$

$$\mu_x = X_{mdio} \pm t \times \frac{s_x}{\sqrt{N}} \quad (3.3)$$

Assim, a partir da distribuição *t-student*, sob um nível de confiança de 95 %, determinaram-se os intervalos nos quais as médias populacionais ( $\mu_x$ ) das variáveis analisadas, isto é, da concentração de proteínas totais e de VLPs, estariam inseridas (Equação 3.3) a partir de N amostragens com médias ( $X_{mdio}$ ) e desvios ( $s_x$ ) conhecidos (SCHWAAB e PINTO, 2007).

### 3.4.1 Immunoblot: revelação e sua avaliação por densitometria

A técnica de immunoblot se baseia na aplicação, a uma membrana de alta adsorção de proteínas, da amostra seguida de anticorpo(s) para detecção específica. Os estágios de incubação e bloqueio foram mantidos em sistema agitado (equipamento modelo IKA®KS 130 Basic) para que não houvesse zonas estagnadas.

Inicialmente, após a aplicação das amostras na membrana, esta foi imersa em solução de bloqueio. Esta solução, composta por leite em pó desnatado (5 % m/v), Tween-20 (0,05 % v/v) e tampão *Tris-buffered saline* (Tris base 20 mM, NaCl 0,137 M e pH 7,4), tem como objetivo bloquear os sítios reativos que poderiam gerar reações cruzadas no teste.

Posteriormente à etapa de bloqueio, sucederam-se as incubações da membrana em soluções contendo o anticorpo primário e, em seguida, o anticorpo secundário, que são diluídos em solução de incubação contendo leite em pó desnatado (0,5 % m/v) e Tween-20 (0,5 % v/v) em TBS.

A etapa de incubação com o anticorpo primário se deu com o anticorpo monoclonal produzido em camundongo 4G2 na diluição 1:5000 (Millipore Corp, EUA; e FIOCRUZ). Este anticorpo monoclonal (mAb) reconhece o *loop* de fusão conservado em flavivírus, permitindo a detecção específica das VLPs de Zika vírus nas amostras. Dois anticorpos

secundários anti-camundongo foram avaliados, sendo um deles conjugado à fosfatase alcalina e o outro à peroxidase de raiz forte (HRP). o anticorpo secundário conjugado à fosfatase alcalina foi produzido em cabra (*goat anti-mouse*, Sigma, EUA), enquanto o conjugado à HRP foi produzido em jumento (*donkey anti-mouse*, Invitrogen, EUA), ambos na diluição de 1:8000.

Dessa forma, o último procedimento consistiu na revelação da membrana. Em revelações empregando fosfatase alcalina, utilizou-se como substrato a mistura de 1:2 de BCIP (Promega, EUA) e NBT (Promega, EUA) em solução de revelação (Tris-HCl 100 mM, NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM e *pH* = 9,5), que permitiu o aparecimento de sinal, no comprimento de onda da luz visível, referente à proteína detectada, isto é, à proteína do envelope presente na VLP. Quando conjugado à HRP, no entanto, o procedimento de revelação demandou a mistura 1:1 de luminol e peróxido de hidrogênio (*ECL<sup>TM</sup> Prime Western Blotting Detection Reagent*, Sigma-Aldrich, Reino Unido), que catalisa uma reação de quimiluminescência, cujo sinal foi determinado por meio do uso de fotodocumentador modelo FluorChemE<sup>TM</sup> (*Protein simple*, EUA).

### **Análise por densitometria ótica**

Alguns autores utilizam densitometria para obter dados quantitativos ou semi-quantitativos a partir de immunoblots. Para tal, segundo MCDONOUGH *et al.* (2015), é imprescindível elucidar a especificidade dos anticorpos utilizados no imunoensaio bem como o comportamento de linearidade entre o sinal dos anticorpos secundários e primários conjugados, e a concentração de proteína, caso este seja o objetivo do ensaio.

Após o procedimento de *Immunoblot* e geração da imagem contendo os sinais da proteína de envelope de Zika vírus, empregou-se o software ImageJ® (NIH, EUA) para o cálculo da intensidade de pixels de cada amostra. Estes sinais, quando comparados a curva de calibração de ajuste linear (software Origin®), construída com concentrações conhecidas da proteína de interesse, permitiram a dosagem de proteínas de envelope de Zika (GALLO-OLLER *et al.*, 2018).

### 3.4.2 Eletroforese em gel e revelação por nitrato de prata

O ensaio de eletroforese em gel permite analisar a composição da amostra ao fazer uso de escala de massa molecular. Após o preparo do gel de poliacrilamida e adição das amostras, ocorre a migração a 150 V das proteínas de diferentes massas moleculares (Figura 3.5), as quais, em solução de Dodecil sulfato de sódio (SDS), encontram-se negativamente carregadas. Ressalta-se, no entanto, que proteínas que possuam resíduos altamente aniônicos podem apresentar repulsão aos íons de SDS, fazendo com que seus padrões de migração sejam diferentes da escala de massa molecular adotada (GHOSH *et al.*, 2014).

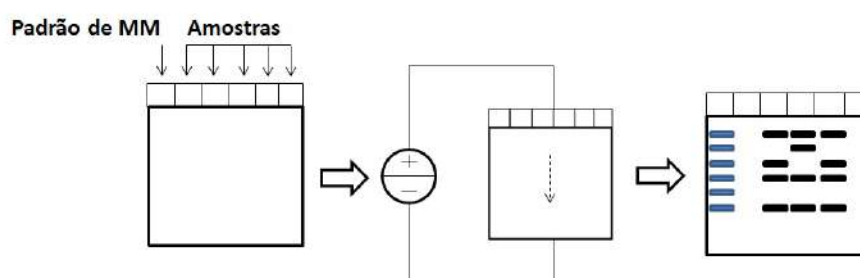


Figura 3.5: Representação do teste SDS-PAGE. MM: Marcador de massa molecular.

Dessa forma, inicialmente, o gel de poliacrilamida 10 % foi gerado a partir das soluções para géis de empilhamento e de separação. O gel de empilhamento, no qual as amostras para análise são injetadas, é composto por persulfato de amônio (PSA) 10 %, TEMED (PlusOne, GE Healthcare Life Sciences, Alemanha), SDS 10 % m/v, solução de acrilamida (30 % m/v)/ bis-acrilamida (0,8 % m/v) em tampão Tris-HCl 0,5 M e  $pH = 6,8$ . O gel de separação é composto por PSA 10 %, TEMED (PlusOne, GE Healthcare Life Sciences, Alemanha), SDS 10 % m/v, solução de acrilamida (30 % m/v)/ bis-acrilamida (0,8 % m/v) em tampão Tris-HCl 1,5 M e  $pH = 8,8$ .

O experimento foi realizado em cuba (modelo Bio-Rad Mini-PROTEAN® Tetra System) por tempo aproximado de 1 hora e 20 minutos e com marcador de massa molecular (MM) comercial (Precision Plus Protein<sup>TM</sup> All Blue Standards, Bio-Rad, EUA; Precision Plus Protein<sup>TM</sup> Unstained Standards, Bio-Rad, EUA; e Precision Plus Protein<sup>TM</sup> Dual Color Standards, Bio-Rad, EUA). O preparo das amostras para injeção consistiu na di-

lução 3:1 em tampão de corrida (50 % de solução Tris-HCl 0,5 M, 8 % m/v SDS, 40 % Glicerol e 0,1 % de Azul de Bromofenol) e exposição à temperatura de 99 °C por 5 minutos sob condição não redutora e desnaturante (equipamento Thermomixer®, Eppendorf). Desta forma, realizaram-se as injeções de 28  $\mu$ L por poço.

Findada a operação, o gel foi submetido ao procedimento de revelação por nitrato de prata, composta das seguintes etapas:

1. Solução de fixação: Etanol 30 %, Ácido acético a 10 % em água ultrapura.
2. Solução de lavagem: Etanol 30 % em água ultrapura.
3. Solução de sensibilização: Tiosulfato de sódio 0,02 % m/v em água ultrapura.
4. Solução de prata: Nitrato de prata 3 % m/v em água ultrapura.
5. Solução de parada: Ácido acético 5 % em água ultrapura.

Segundo SYROVÝ e HODNÝ (1991), a sensibilidade dos testes de revelação de eletroforese é função das características das proteínas avaliadas, sendo a revelação em nitrato de prata limitada pela formação de sinal de fundo (*background*). Este sinal de fundo, sob condições ótimas de revelação, deve ser minimizado, pois ele afeta a reprodutibilidade e a quantificação das bandas das proteínas analisadas.

### **3.4.3 Ensaio de *Western blot***

A técnica de *Western blot* (WB) se realiza a partir da geração do gel de poliacrilamida no procedimento de eletroforese. O gel, com as respectivas bandas de proteínas, é disposto em célula de transferência (TRANS-BLOT SD SEMI-DRY, Bio-Rad) sobre uma membrana, sendo ambos previamente imersos em uma solução de transferência (0,58 % de Tris-base, 0,29 % de Glicina e 0,375 % de solução de SDS 10 %, 20 % de Metanol em água ultrapura). A partir do estabelecimento de corrente elétrica de baixa tensão (15 V), as bandas de proteínas são transferidas para a membrana, sendo esta revelada como descrito anteriormente no item '*Imunoensaio*'. Desse modo, este teste requer a existência de anticorpos que se liguem especificamente à proteína analisada. Neste trabalho,

foi utilizado o anticorpo monoclonal 4G2 como anticorpo primário para os *Western blots* (GHOSH *et al.*, 2014).

#### **3.4.4 Determinação do teor de proteínas totais**

A quantificação de proteínas totais se baseou no ensaio de Bradford, que se dá a partir da mistura do corante comassie blue (Bio-Rad, EUA) com a amostra a ser analisada, sendo a absorbância da mistura registrada a 595 nm e comparada a uma curva padrão de ajuste linear, preparada com albumina de soro bovino (BSA) (Sigma, EUA) (BRADFORD, 1976).

Neste trabalho, utilizaram-se dois equipamentos para as leituras de absorbância, conforme a disponibilidade dos mesmos. A metodologia de Bradford foi avaliada no comprimento de onda de 590 nm em leituras realizadas no equipamento EPOCH 2 (Microplate reader, Bio-tek) e no comprimento de 550 nm em equipamento *EL<sub>x</sub>800* (Universal microplate reader, Bio-tek). Para cada placa de 96 poços contendo as amostras, pois, construiu-se uma curva de calibração em triplicatas analíticas, sendo as leituras realizadas em sistema sem agitação. Adicionalmente, tentou-se minimizar a presença de bolhas, que poderiam prejudicar as leituras de absorbância.

#### **3.4.5 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com coluna de exclusão molecular (SEC)**

O equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência utilizado (modelo LC-20A, Prominence, Shimadzu, Japão) possui as seguintes especificações, conforme ilustrado na Figura 3.6:

- Bomba: LC - 20AT (Shimadzu, Japão)
- Injetor: SIL - 20AC (Shimadzu, Japão)
- Controlador: CBM - 20AV (Shimadzu, Japão)
- Detector UV: SPD 20AV (Shimadzu, Japão)

- Forno: CTO - 20A (Shimadzu, Japão)

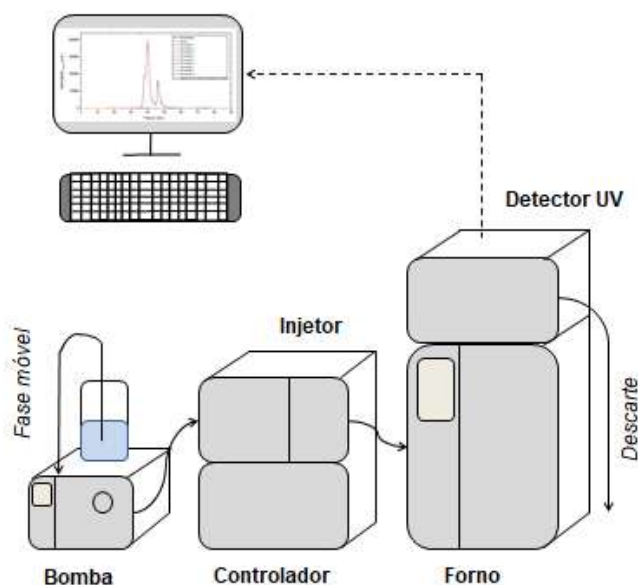


Figura 3.6: Representação de equipamento HPLC com detector acoplado de radiação UV.

Utilizou-se coluna de exclusão molecular (modelo TSKgel G3000 SWxl, 7,8 cm × 30 cm, Tosoh, Japão) e as condições de operação do equipamento foram as seguintes: vazão igual a 300  $\mu\text{L}/\text{min}$ , forno a 30 °C e injeção de 50  $\mu\text{L}$  de amostra. Estas se basearam em indicações do manual do fabricante, em ensaios anteriores do grupo LECC/PEQ/COPPE/UFRJ e no procedimento desenvolvido por STEPPERT *et al.* (2017). Foi utilizada como padrão amostra purificada de VLPs de Zika, obtida por Matheus O. Souza e Tulio M. Lima (LECC/PEQ/COPPE/UFRJ), por meio de duas etapas cromatográficas sequenciais em coluna SartobindQ® (Sartorius, Alemanha) e Captocore 700® (GE Healthcare, Suécia). Seus resultados demonstraram, através de imagens de microscopia eletrônica e ELISA, a presença de VLPs de Zika com diâmetro condizente com a literatura. Deste modo, este material foi injetado ao longo das corridas de SEC-HPLC para determinar o tempo de retenção médio das partículas pseudovirais de Zika (LIMA *et al.*, 2019).

De modo complementar, alíquota de 20  $\mu\text{L}$  contendo proteínas monoméricas de envelope do vírus Zika (Native Antigen Company, Reino Unido) foi submetida à análise para a determinação do tempo de retenção médio destas moléculas pelo sistema.



# Capítulo 4

## Resultados e Discussão

Os experimentos realizados neste trabalho utilizaram alíquotas de sobrenadante de diferentes cultivos em batelada da linhagem celular HEK293 recombinante produtoras de VLPs de Zika vírus. Assim, para fins de controle, registraram-se as datas de coleta, viabilidade celular e concentração de células no meio de cultivo, conforme mostrado na Tabela 4.1.

Tabela 4.1: Especificações do cultivo celular da linhagem HEK293 - 3F6/LECC9 para produção de VLPs de Zika vírus.

Data de coleta	Viabilidade celular (%)	Concentração de células (10 <sup>6</sup> células/mL)
08/02/2018	96,7	3,43
14/02/2018	96,2	10,62
17/02/2018	96,3	5,40
19/02/2018	97,5	6,96
24/05/2018	95,1	6,02
28/05/2018	94,1	15,66
31/05/2018	93,7	10,2
04/06/2018	96,7	9,88
19/06/2018	97,7	11,05
09/08/2018	97,3	8,62
13/08/2018	97,5	11,24
16/08/2018	98,2	9,62
20/08/2018	95,1	15,28
20/09/2018	96,7	9,48
24/09/2018	93,5	14,00
27/09/2018	97,2	9,23
01/10/2018	97,5	13,8

Segundo a Tabela 4.1, os cultivos celulares dos quais os sobrenadantes foram coletados se mantiveram com viabilidade celular acima de 93,5 %, atingindo concentrações de células viáveis na faixa de 3,43 a 15,66 milhões de células por mililitro. O uso dos diferentes sobrenadantes nos experimentos de ultrafiltração é descrito na Figura 4.1.

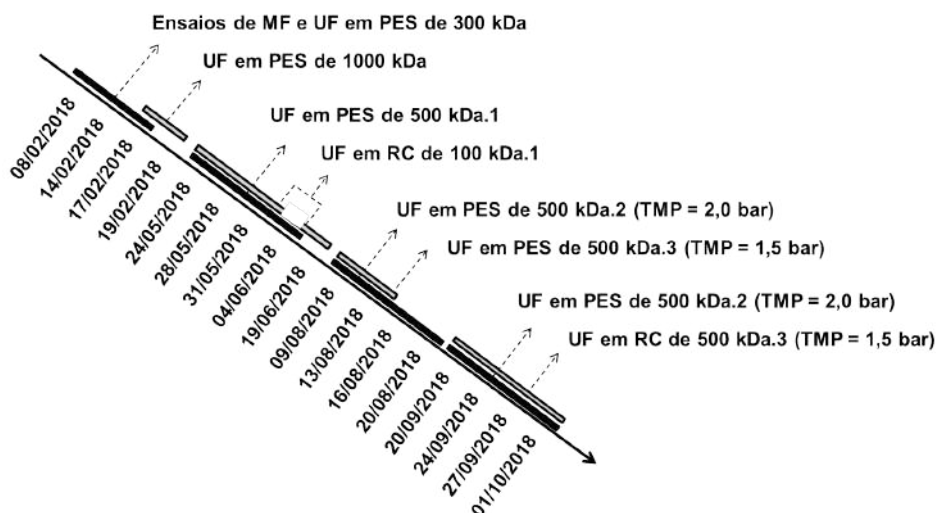


Figura 4.1: Uso de sobrenadante coletados nos experimentos de ultrafiltração. *Detalhamento no apêndice B, item B.1.*

Inicialmente, foram investigadas diferentes membranas de microfiltração para a etapa de clarificação. Em seguida, duas metodologias de ultrafiltração foram avaliadas para a concentração de partículas pseudovirais de Zika vírus contidas em sobrenadante de cultivo celular. Os experimentos iniciais de ultrafiltração consistiram em realizar a separação em dispositivos de ultrafiltração utilizados em centrífugas, com alimentações de sobrenadante iguais a 14 mL, sendo a etapa seguinte composta por testes em batelada em célula de ultrafiltração agitada (Amicon® modelo 8400, Merck, EUA) com capacidade máxima de 400 mL de solução.

## 4.1 Análise da etapa de microfiltração para clarificação de sobrenadante de cultivo celular

A etapa de microfiltração é responsável pela remoção de debris celulares e eventuais aglomerados que poderiam prejudicar a etapa de ultrafiltração. Dessa forma, de modo a avaliar uma possível retenção indesejada de partículas pseudovirais nesta etapa, um experimento foi conduzido em triplicata experimental para comparar diferentes membranas de microfiltração em relação à retenção de VLPs da alimentação, utilizando dispositivo a vácuo da Millipore®.

Neste experimento, foram utilizadas membranas de nitrocelulose de diâmetros médios de poros iguais a  $0,45\ \mu\text{m}$  (Millipore) e  $0,80\ \mu\text{m}$  (Millipore) para investigar a influência do diâmetro de poro na operação e se utilizou uma membrana de PVDF de  $0,45\ \mu\text{m}$  (GE Healthcare) para investigar o efeito do material da membrana na etapa de microfiltração. Os resultados qualitativos obtidos são mostrados na Figura 4.2, onde se observam sinais relativos às proteínas de envelope de Zika nas frações permeadas, em duplicata analítica, bem como na alimentação adotada, em diferentes condições de armazenamento.

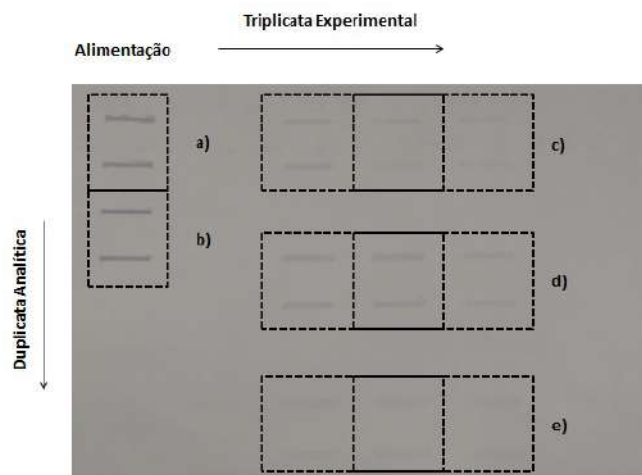


Figura 4.2: *Imunoblot* das frações permeadas de diferentes membranas empregadas na etapa de clarificação (revelação por fosfatase alcalina). a) Alimentação armazenada por 48 horas sob condições não estéreis; b) Alimentação armazenada sob condições estéreis; c) Membrana de nitrocelulose de  $0,45\ \mu\text{m}$ ; d) Membrana de nitrocelulose de  $0,80\ \mu\text{m}$ ; e) Membrana de PVDF de  $0,45\ \mu\text{m}$ .

Conforme evidenciado na Figura 4.2, os sinais obtidos nas frações permeadas sugerem retenção, ainda que reduzida, das VLPs pelas membranas de microfiltração, sendo este efeito mais pronunciado para a membrana de PVDF, em comparação com as membranas de nitrocelulose (Figura 4.2). Este comportamento é suportado pela literatura consultada, ao se enfatizar que o polímero PVDF possui maior caráter hidrofóbico e esta característica pode contribuir para elevada adsorção de proteínas, aumentando, assim, a sua retenção na alimentação. As membranas de nitrocelulose permitiram, portanto, uma melhor permeação das VLPs devido à sua natureza hidrofílica.

Em relação ao tamanho de poro, não foram observadas diferenças significativas nos sinais dos permeados das membranas de RC com  $0,45\ \mu\text{m}$  e  $0,80\ \mu\text{m}$  de tamanho de

poro. Sendo assim, decidiu-se pelo uso da membrana de nitrocelulose de 0,45  $\mu\text{m}$  nos experimentos posteriores.

Além disso, não foram constatadas diferenças significativas nos sinais para os *pools* coletados e armazenados sob condições estéreis e não estéreis (48 horas de exposição, letras 'a' e 'b' da Figura 4.2).

## 4.2 Experimentos preliminares de ultrafiltração

Conforme descrito anteriormente em materiais e métodos, membranas de poliétersulfona de massa molecular de cortes nominais iguais a 300 kDa e 1000 kDa foram avaliadas, por meio do dispositivo Vivaspin® 20 mL (Sartorius, Reino Unido), para verificar a retenção das partículas pseudovirais e avaliar o fator de concentração promovido pelo uso das mesmas.

Inicialmente, realizou-se o teste de *Immunoblot* para as frações retidas e permeadas da membrana de 300 kDa, sendo os resultados mostrados na Figura 4.3.

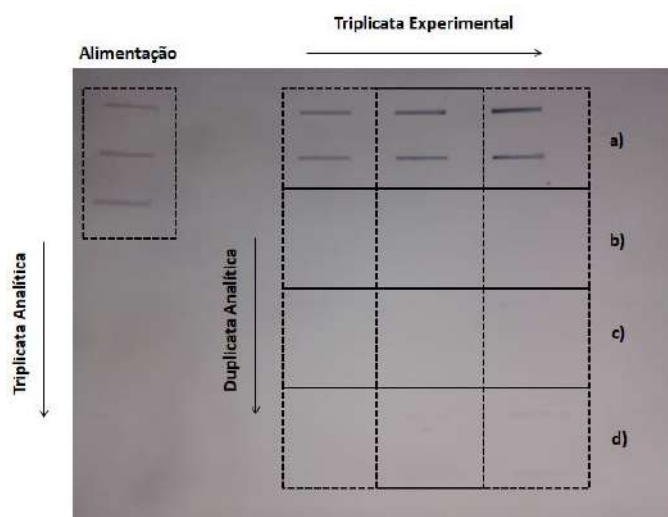


Figura 4.3: *Immunoblot* de frações retidas e permeadas para dispositivo Vivaspin® 20 de *cut-off* igual a 300 kDa (revelação por fosfatase alcalina). a) Fração retida; b) Fração permeada 1; c) Fração permeada 2; d) Fração permeada 3.

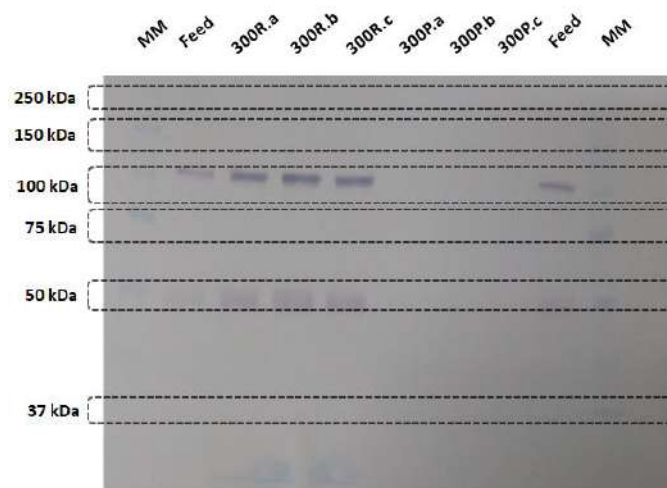
A Figura 4.3 permite inferir que não há permeação expressiva (ao admitir a alimentação como o controle positivo) de proteínas de envelope, sob a forma monomérica ou como VLPs, nas frações permeadas dos 3 ciclos sucessivos de operação, considerando os

experimentos realizados em triplicata. A presença de sinal nas amostras alimentadas e de retido confirma, portanto, a capacidade das membranas de 300 kDa de reter as VLPs.

A fim de avaliar os parâmetros de seletividade e rejeição deste sistema, adotou-se a metodologia de eletroforese em gel, sendo os resultados dados a partir de revelação em solução de nitrato de prata e *Western blot*, mostrados na Figura 4.4.



(a) Revelação em Nitrato de Prata.



(b) *Western blot* (revelação por fosfatase alcalina).

Figura 4.4: Eletroforese em gel de poliacrilamida 10% contendo frações retidas (R) e permeadas (P) da UF em PES de 300 kDa. MM: Marcador de massa molecular (Precision Plus Protein<sup>TM</sup> All Blue Standards, Bio-Rad, EUA); *Feed*: Alimentação contendo VLPs de Zika; As letras 'a', 'b' e 'c' representam as triplicatas experimentais.

Apesar do *background* não ser predominante na Figura 4.4a, a ocorrência de arrastes (indicativo de aumento da concentração de proteínas totais no meio) nas colunas referentes às alíquotas retidas pelas membranas de PES de 300 kDa reduziram a resolução de separação das bandas de massa molecular das proteínas, não sendo possível, portanto, através deste ensaio de eletroforese, concluir a respeito da seletividade da operação.

A proteína de envelope de Zika possui em média 50 kDa de massa molecular, o que coincide com o sinal detectado para as amostras de retido na Figura 4.4b. Adicionalmente, também se observam no *Western Blot* estruturas de 100 kDa, podendo este ser um indicador de dímeros de proteínas de envelope que não foram completamente desnaturados no preparo da amostra.

Este fenômeno, no qual sinais referentes às proteínas de envelope dos Flavivírus se dispõem nas faixas de massa molecular de 50 kDa e 100 kDa, também foi evidenciado pelo *Western blot* realizado em estudo conduzido por METZ *et al.* (2018), onde se demonstrou a presença de estruturas diméricas de partículas pseudovirais dos quatro sorotipos do vírus da *Dengue*, pertencente à família *Flaviviridae*, expressas por células de linhagem HEK293. Esta presença de estruturas diméricas em análise de *Western blot* também foi verificada por PURDY e CHANG (2005) para VLPs de Dengue expressas por células da linhagem *Chinese Hamster Ovary* (CHO).

Dessa forma, ao se admitir a concentração de proteínas de envelope (estrutura monomérica ou dimérica) como indicativo de rejeição das VLPs pelo sistema, a membrana de poliétersulfona de 300 kDa apresentou eficiência satisfatória de retenção, não se observando sinais de proteína E nas frações permeadas. Estes resultados também confirmam que, nos sobrenadantes de cultivo empregados, a proteína E estava presente basicamente na forma de VLPs, e não de proteína E monomérica, que teria permeado através de membrana de 300 kDa.

Com o caráter comparativo, o mesmo procedimento foi aplicado para a membrana de poliétersulfona de 1000 kDa e os resultados do ensaio de *Immunoblot* são mostrados na Figura 4.5.

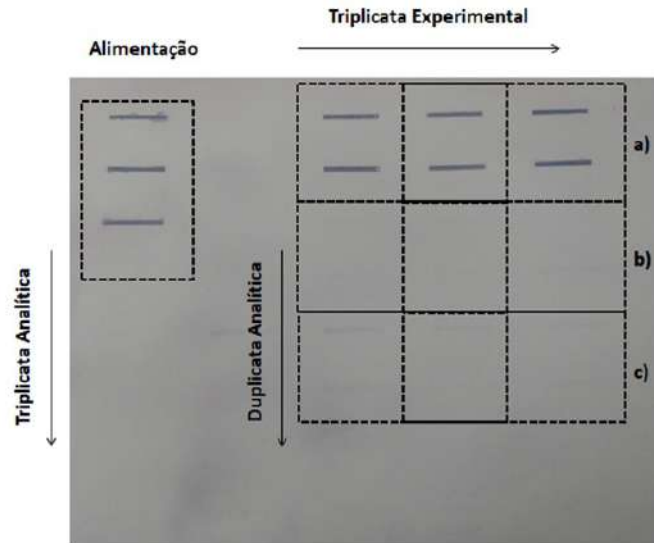
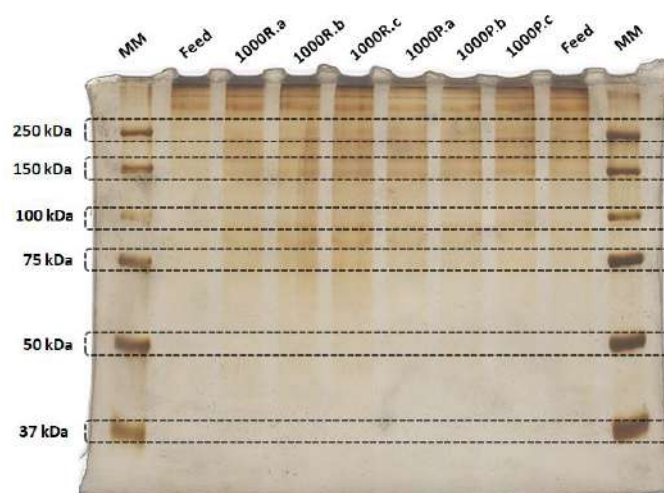


Figura 4.5: *Immunoblot* de frações retidas e permeadas para dispositivo Vivaspin® 20 de *cut-off* igual a 1000 kDa (revelação por fosfatase alcalina). a) Fração retida; b) Fração permeada 1; c) Fração permeada 2.

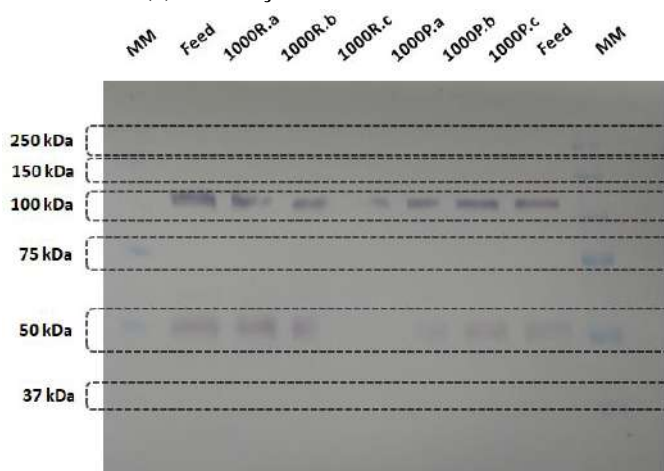
Segundo a Figura 4.5, houve detecção, embora fraca, de proteína E nas amostras de permeado. Considerando que o resultado anterior indicava que o sobrenadante continha basicamente VLPs e não proteína E monomérica, isto significaria retenção apenas parcial das VLPs. Adicionalmente, com base nos sinais gerados pelas amostras retidas pela membrana, não se verificou um fator de concentração expressivo na operação, quando comparado à alimentação. Assim, a operação de separação empregando a membrana de PES de 1000 kDa se caracterizou, qualitativamente, por baixa retenção.

No que se refere ao efeito de seletividade, o ensaio de eletroforese foi realizado e revelações em nitrato de prata e *Western blot* são mostrados na Figura 4.6.





(a) Revelação em Nitrato de Prata.



(b) *Western blot* (revelação por fosfatase alcalina).

Figura 4.6: Eletroforese em gel de poliácridamida 10% contendo frações retidas (R) e permeadas (P) da UF de 1000 kDa. MM: Marcador de massa molecular (Precision Plus Protein<sup>TM</sup> All Blue Standards, Bio-Rad, EUA); *Feed*: Alimentação contendo VLPs de Zika. As letras 'a', 'b' e 'c' representam as triplicatas experimentais.

Semelhantemente ao observado no teste de *Immunoblot*, a Figura 4.6b permitiu concluir que houve permeação de proteínas de envelope, devido à presença de proteínas de envelope com sinal positivo (reativo ao 4G2) nas faixas de 50 kDa e 100 kDa. Adicionalmente, a Figura 4.6a não demonstrou aumento relativo de concentração de proteínas totais, quando comparado à alimentação, apesar de não permitir avaliar a seletividade da operação pela ausência de marcações definidas de massa molecular.

Em estudos de caracterização conduzidos por ALELE e ULBRICHT (2016), a membrana de poliétersulfona de 300 kDa apresentou diâmetro médio de 20 nm sendo este

valor provavelmente maior para a membrana de 1000 kDa. Assim, a permeação de VLPs de Zika poderia ser favorecida pela membrana de 1000 kDa, visto que a VLP possui diâmetro médio de 50 nm e que o diâmetro médio de corte das membranas representa o valor médio de uma distribuição normal.

Dessa forma, diante dos resultados qualitativos obtidos, determinou-se que o melhor desempenho foi obtido com membrana de poliétersulfona de *cut-off* igual a 300 kDa, visto que se verificou permeação parcial de VLPs de Zika através da membrana de PES de 1000 kDa. Este resultado foi considerado para planejar as etapas posteriores deste estudo, onde houve o aumento de escala para célula agitada com capacidade máxima de 400 mL.

### **4.3 Ensaio de aumento de capacidade de ultrafiltração**

Conforme mostrado na seção anterior, a membrana de poliétersulfona de *cut-off* igual a 300 kDa apresentou melhor desempenho do que a de 1000 kDa no que se refere à retenção de proteínas de envelope de Zika contidas nas VLPs de vírus Zika, indicando sua adequabilidade para concentração de VLPs. Nesta segunda etapa, o aumento de capacidade foi investigado em célula Amicon® agitada (modelo 8400, Merck, EUA) e duas membranas foram avaliadas: poliétersulfona de 500 kDa e celulose regenerada de 100 kDa. Ressalta-se, ainda, que os respectivos *cut-offs* foram escolhidos para que a faixa de operação estivesse em torno do valor de 300 kDa determinado na etapa anterior.

#### **4.3.1 Estudo inicial de capacidade de concentração de VLPs de Zika vírus em PES (500 kDa) e RC (100 kDa)**

Os primeiros ensaios objetivaram avaliar, de forma comparativa, as ultrafiltrações empregando membranas de distintos *cut-off*. Os experimentos foram realizados conforme disposto na Figura 4.7, sendo a temperatura ambiente aferida por meio de termômetro digital.

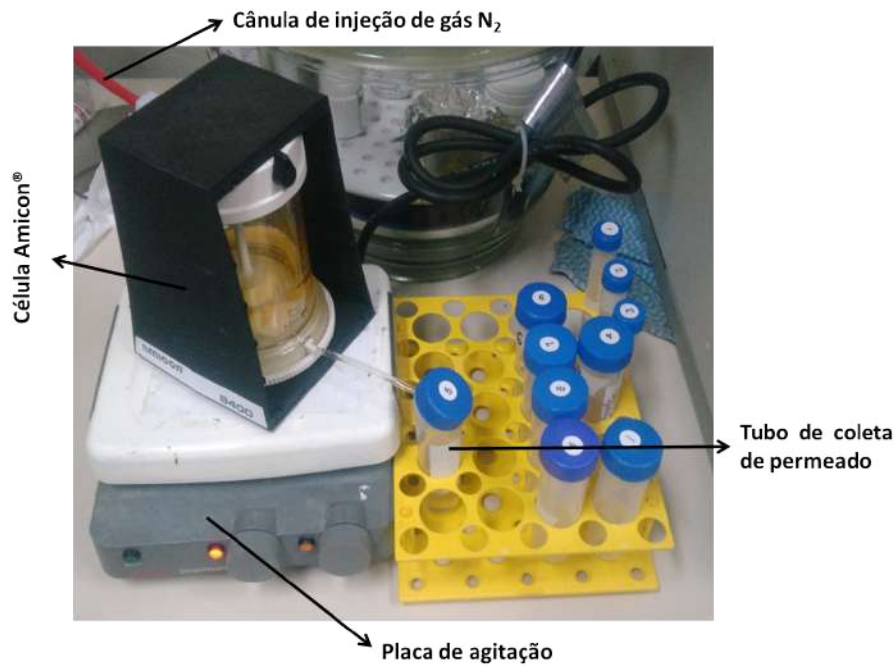


Figura 4.7: Fotografia do aparato experimental utilizado na etapa de ultrafiltração em célula agitada Amicon® (modelo 8400, Merck, EUA).

Sabe-se que filtrações *dead-end* são caracterizadas pela expressiva queda de fluxo com o aumento do tempo de operação. Este comportamento, evidenciado na Figura 4.8, foi confirmado pela redução do fluxo para um *plateau* mínimo após, aproximadamente, 17 minutos de operação.

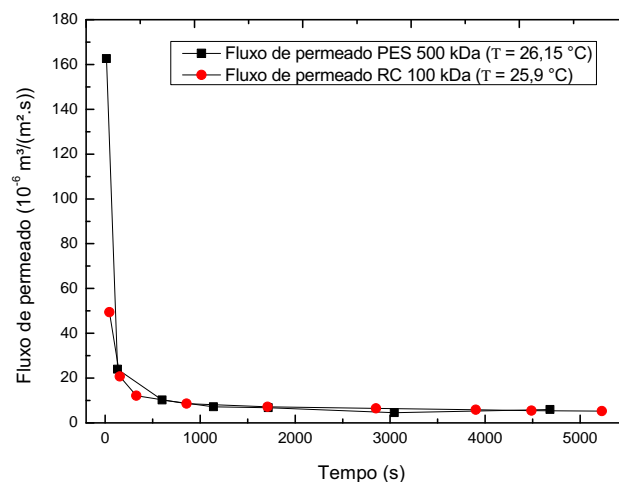


Figura 4.8: Fluxo de permeado para ultrafiltrações em PES (500 kDa) e RC (100 kDa) de sobrenadante de cultivo celular contendo VLPs de Zika a 2 bar.

Conforme esperado, o fluxo inicial da membrana de PES de 500 kDa foi maior que o

da membrana RC de 100 kDa. No entanto, devido à severa incrustação das membranas, os valores finais de fluxo de permeado foram equivalentes; sendo os fatores de concentração volumétricos obtidos iguais a, aproximadamente, 6 vezes e 7,5 vezes, respectivamente.

Segundo a Equação 2.3, a resistência da ultrafiltração é representada pelo inverso do fluxo mínimo observado. Assim, considerando-se as últimas medições da operação (n = 3), os fluxos mínimos e as resistências ( $R_T$ ) foram calculados e são fornecidos na Tabela 4.2.

Tabela 4.2: Resultados de desempenho das ultrafiltrações em PES de 500 kDa e RC de 100 kDa.

Descrição	Fluxo mínimo ( $\times 10^{-6} \frac{m^3}{m^2 \cdot s}$ )	Resistência ( $\times 10^6 \frac{m^2 \cdot s}{m^3}$ )
PES de 500 kDa	5,75 ± 1,14	0,17 ± 0,035
RC de 100 kDa	5,53 ± 0,34	0,18 ± 0,011

As informações contidas na Figura 4.8 demonstram reduções de fluxo de permeado condizentes com a literatura consultada para filtrações convencionais. Este fenômeno é consequência da formação de depósitos de matéria orgânica na superfície da membrana, conforme descrito por MULDER (1995) e CHEREMISINOFF (2002), apesar da agitação presente no sistema. Ao admitir as três últimas aferições experimentais como referência, as membranas de PES de 500 kDa e RC de 100 kDa apresentaram desempenho equivalente em termos de fluxo mínimo e  $R_T$ , apesar das diferenças de material e tamanho de poro das membranas (Tabela 4.2). Esta ocorrência pode ser um indicativo de limitações por transferência de massa impostas ao processo (MULDER, 1995; BAKER, 2004).

Assim, de modo a avaliar a capacidade de concentração de VLPs de Zika vírus, o ensaio de *Immunoblot* foi aplicado para as frações alimentadas, retidas e permeadas nas operações de ultrafiltração, sendo os resultados fornecidos na Figura 4.9.

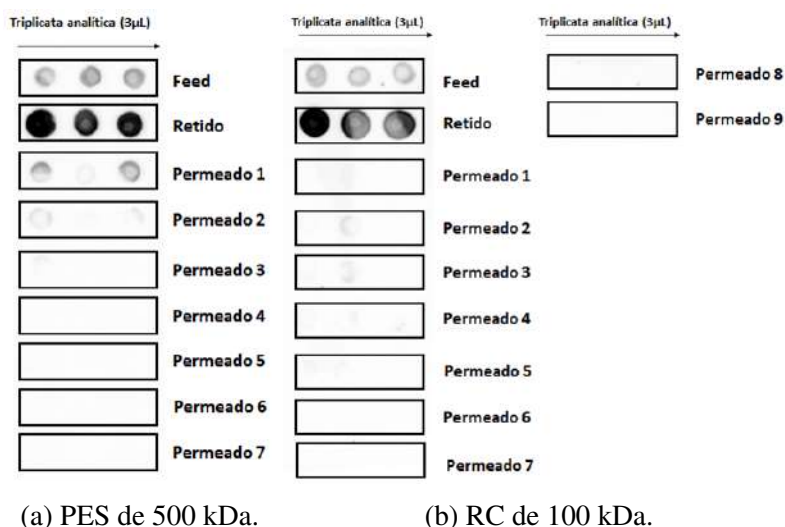


Figura 4.9: *Immunoblot* para as frações alimentadas, retidas e permeadas das operações de ultrafiltração em PES (500 kDa) e RC (100 kDa) a 2 bar (revelação por peroxidase/D-HRP). *Feed*: Alimentação contendo VLPs de Zika.

A Figura 4.9 mostra aumento da intensidade de sinal das frações retidas, em relação à alimentação, para ambas membranas. A operação de ultrafiltração, portanto, foi capaz de promover a concentração.

De forma a complementar as informações qualitativas obtidas, a metodologia de Bradford foi aplicada para as frações alimentadas e retidas, para as membranas de 100 kDa e 500 kDa. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3: Concentrações de proteínas totais para frações recolhidas em ultrafiltrações ( $\Delta P = 2$  bar) em PES de 500 kDa e em RC de 100 kDa, em triplicata analítica. (Ajuste linear:  $R^2 = 0,98173^*$ ,  $p < 0,05$ ). Valores amostrais dados no Apêndice B.2.

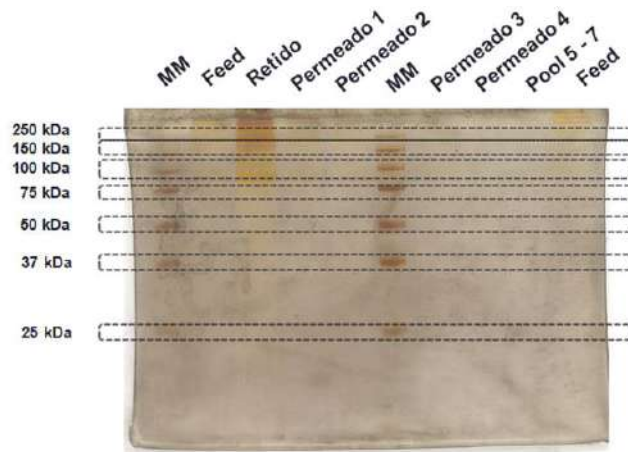
Descrição	PES de 500 kDa ( $\mu\text{g/mL}$ )	RC de 100 kDa ( $\mu\text{g/mL}$ )
Alimentação	$33,9 \pm 5,5$	$36,9 \pm 31,5$
Fração retida	$53,1 \pm 30,0$	$55,4 \pm 3,7$

Conforme evidenciado na Tabela 4.3, os valores médios indicaram aumento da concentração de proteínas totais nas frações retidas, em relação às alimentações; sendo inferior aos fatores de concentração obtidos, o que demonstra que proteínas contaminantes foram removidas pela ultrafiltração. No entanto, os elevados desvios não permitiram

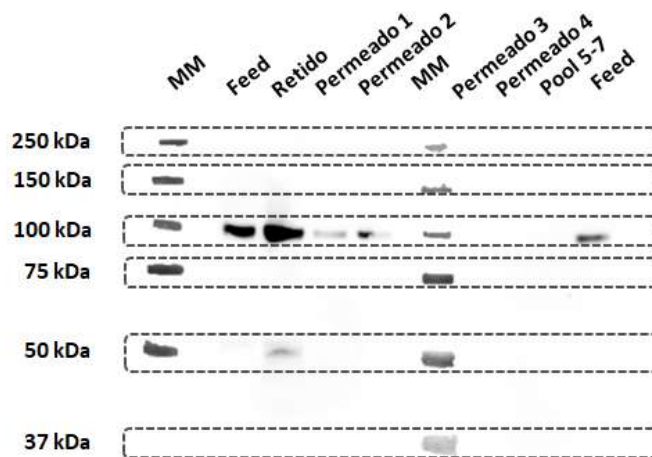
afirmar, à luz da estatística experimental (a um nível de confiança de 95 %), que as ultrafiltrações concentraram significativamente as amostras. Além disso, na alimentação estão presentes outras proteínas monoméricas produzidas pelas células, que provavelmente são removidas no permeado. Estes dados, portanto, foram complementados com os testes qualitativos de eletroforese em gel com revelação em nitrato de prata e *Western blot*.

### **Membrana de PES de 500 kDa**

A partir do comportamento de queda de fluxo evidenciada na Figura 4.8, tornou-se imprescindível avaliar a seletividade do sistema, estudando-se primeiramente a membrana de PES 500 kDa, tendo em vista o *plateau* mínimo de fluxo indicar aumento das resistências de transporte e, conseqüentemente, aumento da retenção de proteínas pela membrana. Assim, a Figura 4.10 exibe as imagens obtidas pelos procedimentos de eletroforese em gel seguida por revelação em nitrato de prata e *Western blot*, de modo a complementar as informações fornecidas anteriormente no ensaio de Bradford.



(a) Revelação em Nitrato de Prata.



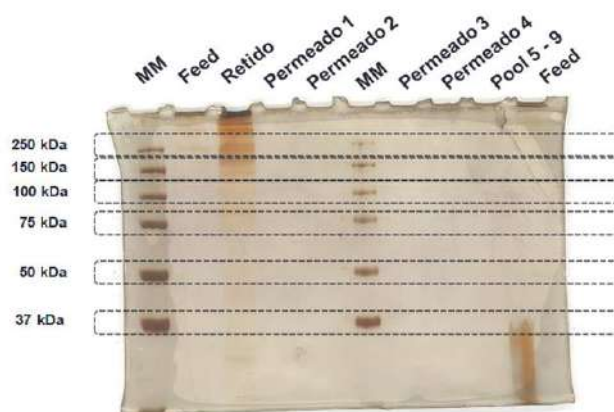
(b) *Western blot* (revelação por peroxidase/D-HRP).

Figura 4.10: Eletroforese em gel poliacrilamida 10% contendo frações retidas (R) e permeadas (P) da UF de 500 kDa. MM: Marcador de massa molecular (Precision Plus Protein<sup>TM</sup> All Blue Standards, Bio-Rad, EUA); *Feed*: Alimentação contendo VLPs de Zika; *Pool 5 - 7*: Mistura de mesma proporção das frações permeadas 5 a 7.

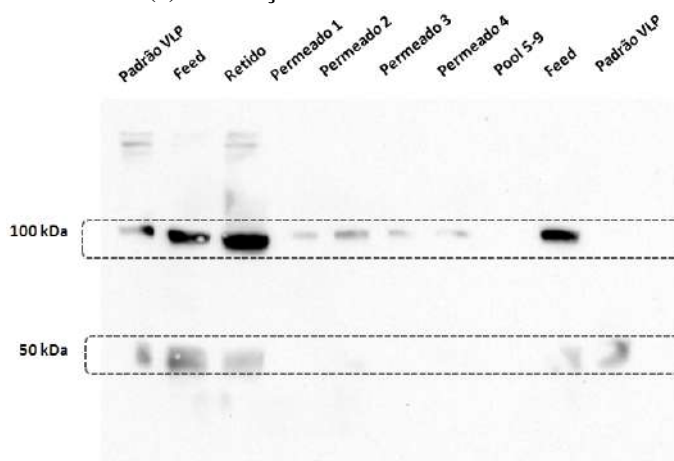
Apesar da ausência de bandas definidas na Figura 4.10a, o arraste presente na alíquota 'Retida' fornece indício de aumento da concentração de proteínas e se situa acima da fração de massa molecular de 100 kDa. Constata-se, ainda, que a Figura 4.10b demonstra aumento da concentração de proteínas de envelope, sob a forma dimérica (MM: 100 kDa), na fração retida, enquanto indica permeação de proteínas E (MM: 50 kDa) nos instantes de coleta 1 e 2 (permeado 1 e 2). Não são observadas, contudo, demais perdas no experimento, apesar da forma monomérica de proteína de envelope não se apresentar uniformemente no ensaio de *Western blot*. Assim, admitiu-se que o sistema não apresentou expressivas perdas de VLPs e foi capaz de concentrar, a princípio, estas partículas.

## Membrana de RC de 100 kDa

De forma similar ao procedimento realizado para as amostras de ultrafiltração em membrana de poliétersulfona de 500 kDa, o procedimento de eletroforese em gel das amostras da UF em membrana de RC de 100 kDa resultou nas imagens expressas na Figura 4.11.



(a) Revelação em Nitrato de Prata.



(b) Western blot (revelação por peroxidase/D-HRP).

Figura 4.11: Eletroforese em gel poliacrilamida 10% contendo frações retidas (R) e permeadas (P) da UF de 100 kDa. MM: Marcador de massa molecular (Precision Plus Protein<sup>TM</sup> Unstained Standards, Bio-Rad, EUA); *Feed*: Alimentação contendo VLPs de Zika. Padrão de VLP: alíquota purificada de produção *in-house* de VLP de Zika.

Apesar da ausência de significância estatística acerca do aumento da concentração de proteínas totais, conforme mostrado na Tabela 4.3, a Figura 4.11a demonstra em sua coluna de 'Retido' arraste indicativo de aumento da concentração de proteínas acima de 100 kDa, sendo este valor condizente com o *cut-off* nominal da membrana de celulose rege-



nerada. No entanto, segundo a Figura 4.11b, houve a permeação de proteínas de envelope de Zika vírus nas quatro primeiras frações coletadas na ultrafiltração, não sendo constatado, ainda, um expressivo fator de concentração destas na amostra retida em relação à alimentação.

Assim, apesar dos sistemas empregarem membranas de diferentes *cut-off* e possuírem características físico-químicas distintas, a alta redução de fluxo evidenciada (Figura 4.8) fornece indícios de mudança das condições de transporte do soluto ao longo da operação de separação. Os sinais observados nas frações permeadas nos ensaios de *Immunoblot* (Figura 4.9), complementados com os *Western blot* (Figuras 4.10b e 4.11b), descrevem maior efeito de rejeição das proteínas de envelope para a membrana de poliétersulfona, apesar de seu maior *cut-off* favorecer as condições teóricas de transporte convectivo das VLPs pela matriz porosa do material. Isto reforça a hipótese de resistências adicionais ao processo ocasionadas pela incrustação das membranas, produzindo uma camada filtrante capaz de aumentar a retenção das VLPs.

### **4.3.2 Efeito da pressão de operação sobre o desempenho das membranas**

Os experimentos anteriores aplicando as membranas de poliétersulfona de 500 kDa e celulose regenerada de 100 kDa permitiram inferir aspectos iniciais sobre a separação e retenção de proteínas de envelope de Zika. Os resultados obtidos indicaram melhor retenção de proteínas E pela membrana de PES, enquanto se constatou permeação parcial das mesmas até o alcance da condição de equilíbrio de fluxo de permeado para a membrana de RC. Assim, ao considerar que parte majoritária dos sinais das proteínas de envelope descritos nos *Immunoblots* se refere às VLPs, admitiu-se a membrana de PES como referência nesta etapa do estudo, onde se objetivou avaliar a variação do comportamento de fluxo de permeado com alterações da pressão de operação (TMP).

Dessa forma, este procedimento consistiu em realizar duas bateladas de ultrafiltração com membrana de poliétersulfona de 500 kDa, sendo esta intercalada por um processo de limpeza antes do reuso (conforme descrito no item 3.4.2 na 'Metodologia Experimental').

Tendo em vista o reuso da membrana, os valores de permeabilidade hidráulica foram calculados após o procedimento de limpeza, sendo descritos na Tabela 4.4 e representados graficamente na Figura 4.12.

Tabela 4.4: Permeabilidades hidráulicas calculadas para a membrana de poliétersulfona de 500 kDa em função de seus reusos. (Ajustes lineares:  $R_{Nova}^2 = 0,96252$ ,  $R_{1x}^2 = 0,99348^*$ ,  $R_{2x}^2 = 0,99938^*$ ;  $p < 0,05$ ).

Descrição	Permeabilidade hidráulica ( $\times 10^{-4} \frac{m^3}{m^2 \cdot bar \cdot s}$ )
Membrana nova	$5,67 \pm 1,27$
Após o primeiro uso	$3,60 \pm 0,53$
Após o segundo uso	$4,58 \pm 0,57$

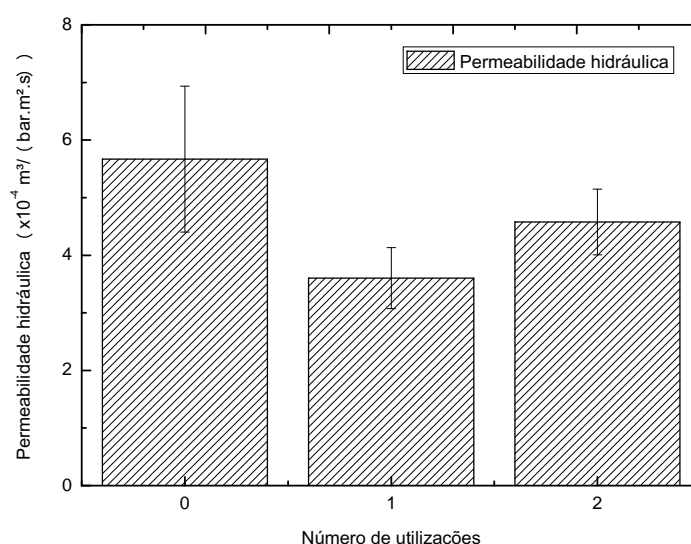


Figura 4.12: Permeabilidade hidráulica calculada para membrana de PES de 500 kDa em função de seu reuso.

A redução de fluxo de permeado ao longo da operação de separação (Figura 4.12) pode ser atribuída a diversos fatores, sendo o primeiro uso da membrana responsável pela redução de  $(36,46 \pm 23,58) \%$  de sua permeabilidade hidráulica. Segundo estudo conduzido por STADE *et al.* (2013), as membranas poliméricas são susceptíveis ao fenômeno de compactação, caracterizada pela redução do fluxo de permeado decorrente do aumento de pressão do sistema e mudança (elástica ou vítrea) de sua estrutura. Dessa forma, a

queda de permeabilidade inerente ao primeiro uso da membrana representa um possível efeito combinado de compactação e *fouling*. Após seu segundo uso, determinou-se um valor de permeabilidade hidráulica inserido na mesma faixa de incerteza experimental que o uso anterior, não sendo constatado, pois, efeitos expressivos de *fouling*.

Assim, o reuso da membrana permitiu gerar curvas reprodutíveis de queda de fluxo de permeado, conforme mostrado na Figura 4.13, sendo seus parâmetros fornecidos na Tabela 4.5.

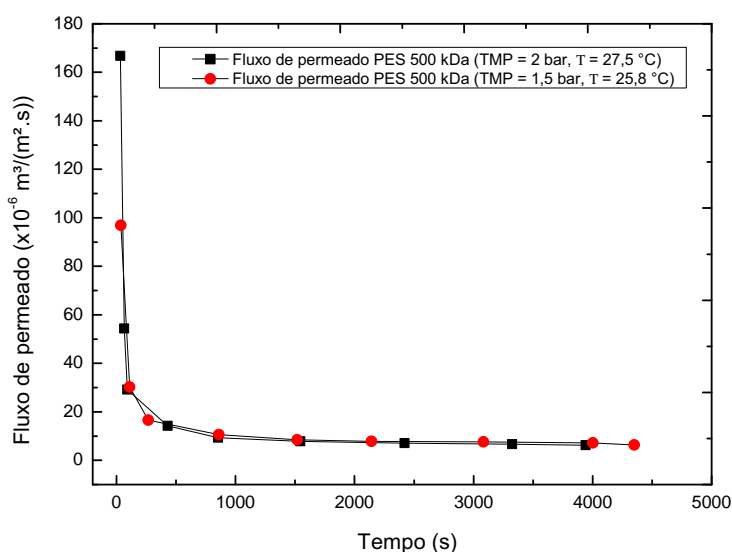


Figura 4.13: Fluxo de permeado para as ultrafiltrações de sobrenadante de cultivo celular contendo VLPs de Zika em membrana de PES (500 kDa) a diferentes pressões de operação: 2 bar e 1,5 bar.

Tabela 4.5: Resultados de desempenho das ultrafiltrações em PES de 500 kDa ( $\Delta P = 2 \text{ bar}$  e  $\Delta P = 1,5 \text{ bar}$ ).

Descrição	Fluxo mínimo ( $\times 10^{-6} \frac{\text{m}^3}{\text{m}^2 \cdot \text{s}}$ )	Resistência ( $\times 10^6 \frac{\text{m}^2 \cdot \text{s}}{\text{m}^3}$ )
PES ( $\Delta P = 2 \text{ bar}$ )	$6,65 \pm 0,43$	$0,15 \pm 0,01$
PES ( $\Delta P = 1,5 \text{ bar}$ )	$7,04 \pm 0,67$	$0,14 \pm 0,01$

Segundo BAKER (2004), a variação de pressão da operação ocasiona mudanças na taxa de deposição de materiais sobre a superfície membrana. Portanto, o aumento de pressão, apesar de gerar inicialmente maiores valores de fluxo, tende a gerar uma camada

gel depositada mais densa e de menor permeabilidade. Este fenômeno é verificado com base nos valores médios expostos na Tabela 4.5, onde sob a pressão de 2 bar o sistema apresenta em suas últimas alíquotas de permeado ( $n = 3$ ) uma resistência à filtração igual a  $(0,1504 \pm 0,0097) (\times 10^6 \frac{m^2 \cdot s}{m^3})$ , sendo este valor superior ao obtido para a camada depositada a 1,5 bar. Apesar desta ocorrência, os desvios experimentais não permitem inferir com certeza sobre este fenômeno. Assim, a partir do ensaio de *Immunoblot*, investigou-se a capacidade de concentração das proteínas de envelope pelos sistemas, sendo os resultados mostrados na Figura 4.14.

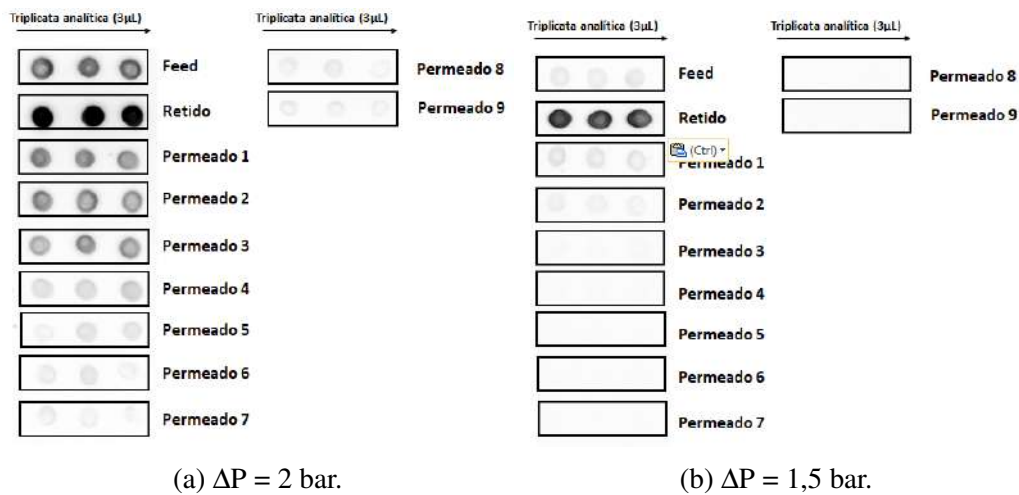


Figura 4.14: Ensaio de *Dot Blot* para frações das ultrafiltrações em PES de 500 kDa a diferentes  $\Delta P$ : 2 bar e 1,5 bar (revelação por peroxidase/D-HRP). *Feed*: Alimentação contendo VLPs de Zika vírus.

Observa-se na Figura 4.14 distintos sinais de proteínas de envelope de Zika para as alimentações empregadas, podendo esta variação ocasionar diferentes retenções pela membrana. Adicionalmente, constata-se maior detecção de proteínas de envelope de Zika nas frações iniciais de permeado, até o estabelecimento do fluxo mínimo (Figura 4.13). Desta maneira, com o objetivo de avaliar a capacidade de concentração de proteínas E e a seletividade da operação, o ensaio de Bradford foi aplicado para a quantificação de proteínas totais das alíquotas coletadas dos sistemas de separação, sendo os resultados mostrados na Tabela 4.6.

Tabela 4.6: Concentrações de proteínas totais para frações recolhidas em ultrafiltrações em PES de 500 kDa ( $\Delta P = 2$  bar e 1,5 bar), em triplicata analítica. (Ajuste linear $_{\Delta P=2bar}$  :  $R^2 = 0,97695^*$ ,  $p < 0,05$ ; Ajuste linear $_{\Delta P=1,5bar}$  :  $R^2 = 0,99164^*$ ,  $p < 0,05$ ). Valores amostrais dados no Apêndice B.3.

Descrição	PES ( $\Delta P = 2$ bar) ( $\mu\text{g/mL}$ )	PES ( $\Delta P = 1,5$ bar) ( $\mu\text{g/mL}$ )
Alimentação	110,400 $\pm$ 45,608	62,143 $\pm$ 9,964
Fração retida	305,894 $\pm$ 41,315	358,026 $\pm$ 27,809

A partir da Tabela 4.6, é possível afirmar que houve aumento de concentração das proteínas totais do sistema, conforme indicado pelo *Immunoblot*, a um nível de 95 % de confiança. Complementarmente, a partir da metodologia de densitometria, determinou-se a concentração de proteínas de envelope de Zika, sendo estes resultados mostrados pela Tabela 4.7.

Tabela 4.7: Concentrações de proteínas de envelope de Zika para frações recolhidas em ultrafiltrações em PES de 500 kDa ( $\Delta P = 2$  bar e 1,5 bar), em triplicata analítica. (Ajuste linear:  $R^2 = 0,98842^*$ ,  $p < 0,05$ ). Valores amostrais dados no Apêndice B.4.

Descrição	PES ( $\Delta P = 2$ bar) ( $\mu\text{g/mL}$ )	PES ( $\Delta P = 1,5$ bar) ( $\mu\text{g/mL}$ )
Alimentação	8,991 $\pm$ 1,636	6,822 $\pm$ 1,880
Fração retida	79,078 $\pm$ 23,117	48,628 $\pm$ 20,617

Assim, diante dos valores expostos na Tabela 4.7, calcularam-se os coeficientes de rejeição para a membrana de poliétersulfona em operações a 2 bar e 1,5 bar, sendo estes descritos na Figura 4.15.

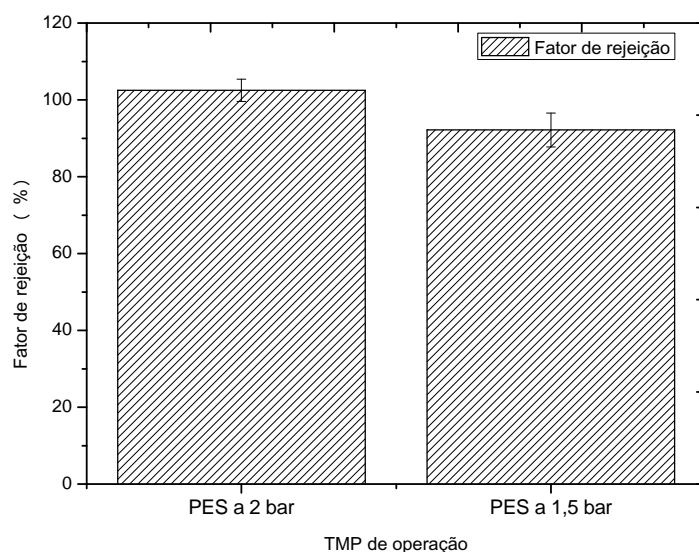
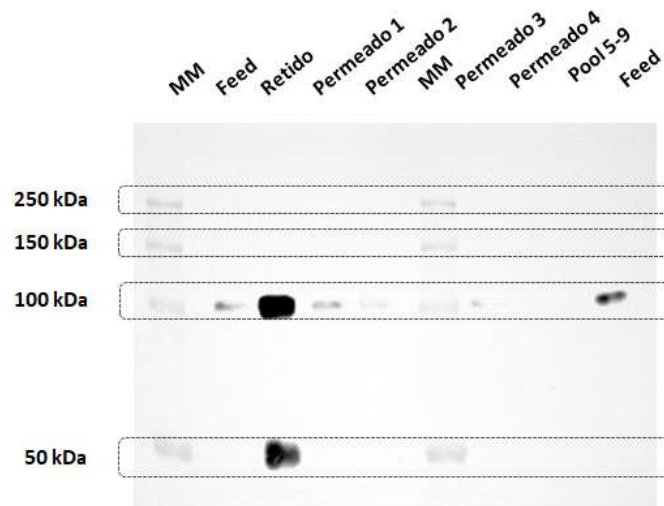


Figura 4.15: Fatores de rejeição a proteínas de envelope de Zika calculados para membrana de PES de 500 kDa a diferentes pressões de operação.

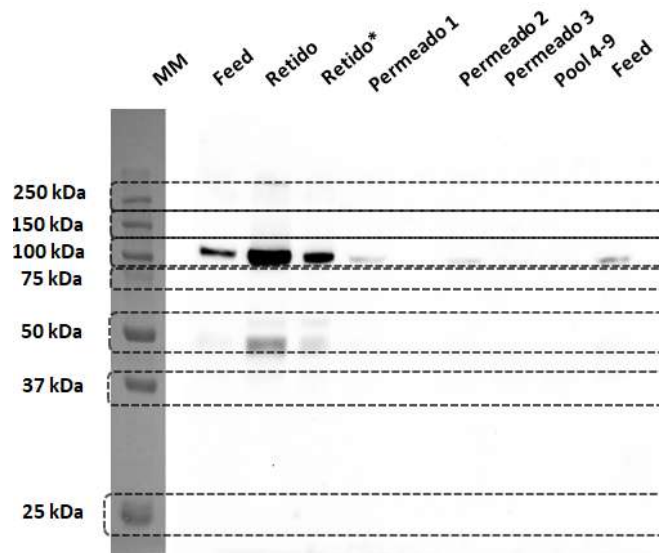
Segundo os resultados supracitados, é possível concluir que a membrana de PES de 500 kDa apresentou desempenhos semelhantes a diferentes pressões, em termos dos coeficientes de rejeição. Contudo, análises de *Western blot* foram realizadas para confirmar os resultados, conforme mostrado na Figura 4.16.

As imagens de *Western blot* corroboram as informações fornecidas pela Figura 4.14 em relação à retenção das VLPs. Confirma-se que as estruturas das proteínas de envelope se situam nas faixas de 50 kDa e 100 kDa, sendo estas massas moleculares condizentes com a literatura. Desta forma, conclui-se que ambas pressões de operação (1,5 bar e 2,0 bar) resultaram em desempenhos estatisticamente semelhantes e que, neste caso, pressões de operação mais baixas podem ser vantajosas pelo menor custo energético e pela maior queda do fluxo para longos tempos de operação.

Para distinguir a presença de proteínas de envelope de Zika vírus sob a forma monomérica, em relação às presentes nas VLPs, análises em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência com coluna de exclusão molecular foram realizadas. Adotaram-se como padrões VLPs de Zika vírus purificadas por cromatografia (produção *in-house*) e proteínas monoméricas de envelope de Zika vírus (padrão comercial, Native Antigen Company, Reino Unido). Os resultados são mostrados nas Figuras 4.17, 4.18 e 4.19.



(a)  $\Delta P = 2$  bar.



(b)  $\Delta P = 1,5$  bar.

Figura 4.16: *Western blot* a partir de gel de poliacrilamida 10% contendo frações retidas (R) e permeadas (P) da UF em PES de 500 kDa ( $\Delta P = 2$  bar e 1,5 bar) (revelação por peroxidase/D-HRP). MM: Marcador de massa molecular (Precision Plus Protein<sup>TM</sup> Dual Color Standards, Bio-Rad, EUA); *Feed*: Alimentação contendo VLPs de Zika; *Retido\**: massa de proteínas totais igual a contida na coluna de *Feed*; *Pool*: Mistura de mesma proporção das frações permeadas descritas. Para ambas figuras, houve a sobreposição das imagens colorimétricas e de quimiluminescência por programa de edição gráfica.

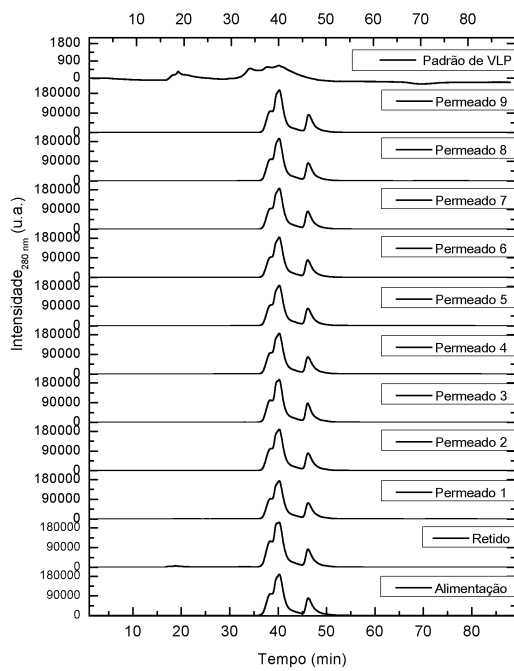
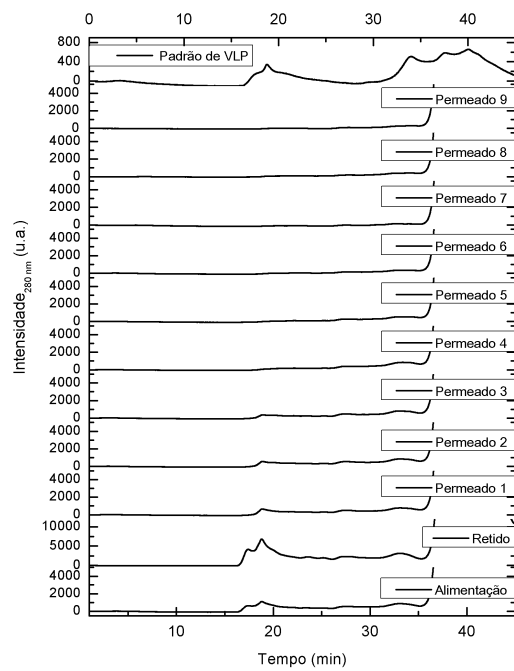


Figura 4.17: Cromatogramas das frações da ultrafiltração em PES de 500 kDa a 2 bar: alimentação, fração retida, frações permeadas e padrão de VLP de Zika vírus (produção *in-house*).



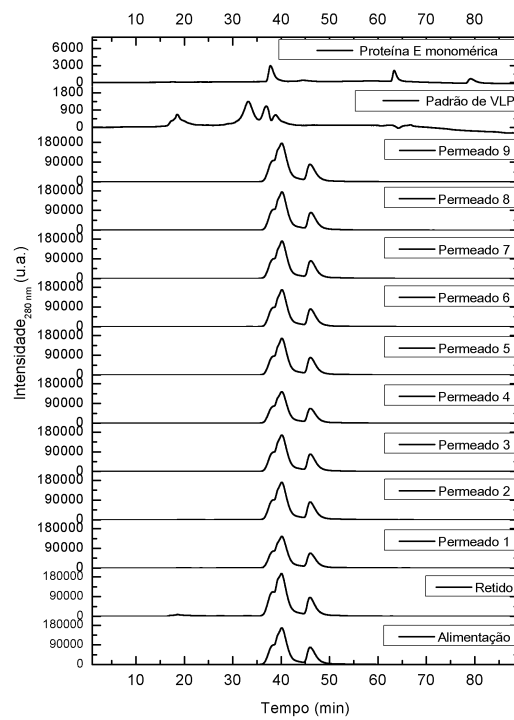
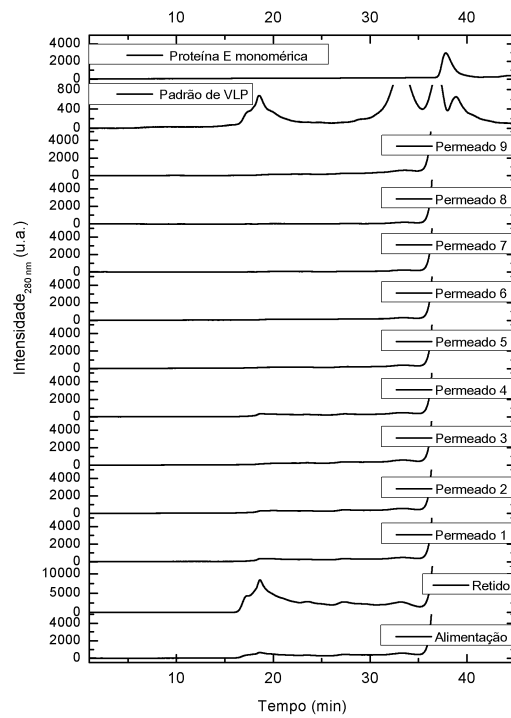
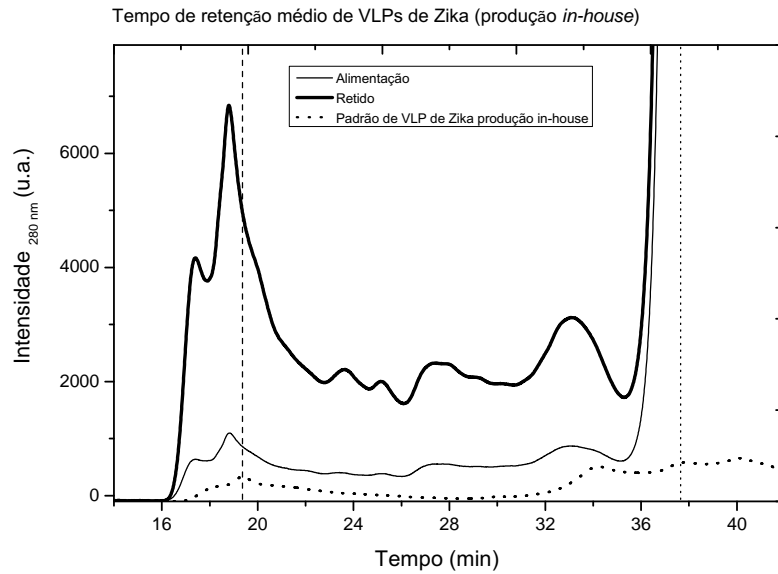


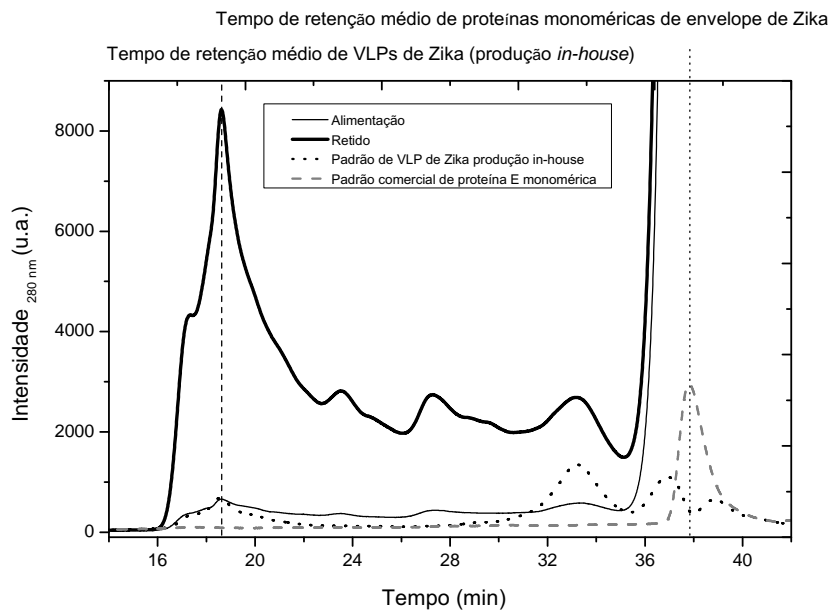
Figura 4.18: Cromatogramas das frações da ultrafiltração em PES de 500 kDa a 1,5 bar: alimentação, fração retida, frações permeadas, padrão de VLP de Zika vírus (produção *in-house*) e padrão comercial de proteína de envelope monomérica do vírus Zika (Native Antigen Company, Reino Unido).

As Figuras 4.17 e 4.18 descrevem os cromatogramas obtidos para as amostras recolhidas nas ultrafiltrações a 2 bar e 1,5 bar em membrana de PES de 500 kDa. Constata-se eluição de partículas em três diferentes tempos de retenção, sendo estes, aproximadamente, iguais a 18 minutos, 40 minutos e 47 minutos. Este mesmo padrão se mantém na Figura 4.18, onde também é mostrada a eluição de alíquota comercial padrão de proteínas de envelope monoméricas do vírus Zika (Native Antigen Company, Reino Unido) em tempo de retenção aproximado de 37 minutos. Contudo, devido ao alto valor de intensidade obtida para o pico entre os tempos de 40 e 47 minutos, um segundo cromatograma foi esboçado para as frações alimentadas e retidas nas ultrafiltrações realizadas (Figura 4.19).

Conforme mostrado na Figura 4.19, houve aumento da intensidade de sinal observado no tempo de eluição médio das VLPs de Zika vírus (fração retida em relação à alimentação). Este tempo foi determinado anteriormente pelo laboratório LECC/PEQ/COPPE/UFRJ e se baseou no volume morto da coluna, ao se admitir que as partículas pseudovirais são maiores que os poros presentes na coluna. Assim, estes cromatogramas serviram de base qualitativa, ao superestimar em parte o aumento de concentração observado.



(a) Ultrafiltração em PES de 500 kDa a 2 bar: alimentação, fração retida e padrão de VLP de Zika (produção *in-house*).



(b) Ultrafiltração em PES de 500 kDa a 1,5 bar: alimentação, fração retida, padrão de VLP de Zika (produção *in-house*) e padrão comercial de proteínas de envelope do vírus Zika (Native Antigen Company, Reino Unido).

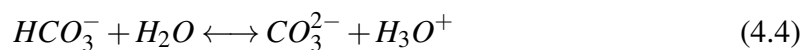
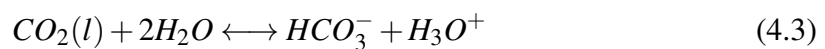
Figura 4.19: Cromatogramas, com ênfase no tempo de retenção das VLPs de Zika, das frações da ultrafiltração em PES de 500 kDa injetadas em sistema HPLC/SEC-UV.

Com base nestes resultados, pode-se afirmar que o sistema de ultrafiltração representa uma operação capaz de concentrar as partículas pseudovirais de Zika vírus (Figura 4.19), suplementando as informações obtidas por *immunoblot* (Figura 4.14), em conjunto com

as concentrações obtidas de proteínas totais (Tabela 4.6) e concentrações de proteínas de envelope (Tabela 4.7).

A retenção de proteínas por membranas de ultrafiltração é amplamente descrita na literatura, sendo diversos fatores atribuídos à rejeição da proteína de interesse. Segundo HUISMAN *et al.* (2000), as interações entre as proteínas em solução com as proteínas na superfície da membrana afetam diretamente sua eficiência de separação, sendo fatores como pH e ponto isoelétrico (pI) da proteína imperativos em sua retenção.

Neste estudo, o sobrenadante de cultivo celular (pH inicial = 7,1) se caracteriza pela presença de um agente tamponante (carbonato/bicarbonato) que, sob condições atmosféricas padrão, tende a sofrer um leve aumento de pH do meio, segundo as equações de equilíbrio (Equações 4.1 a 4.4) descritas por KNUUTILA *et al.* (2010). Este fenômeno se deve à redução da concentração de CO<sub>2</sub> na atmosfera, que desloca o equilíbrio para a hidrólise do íon HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> e aumento do pH da solução. Assim, sob estas condições de pH, e com base nas análises de ALELE e ULBRICHT (2016), a membrana de poliétersulfona se apresenta negativamente carregada e proporciona interações hidrofílicas (nos instantes iniciais da operação) com as proteínas em solução.



Segundo BAKER (2004), operações a pressões reduzidas contribuem para a redução dos depósitos orgânicos sobre a membrana e para a minimização das tendências de *fouling*. Assim, apesar da operação conduzida a 2 bar gerar resultados quantitativos favoráveis à sua aplicação, os experimentos posteriores objetivaram investigar se o aumento da concentração de VLPs de Zika vírus no *feed* e o uso de um mesmo *pool* de sobrenadante de cultivo celular permitiriam obter dados reprodutíveis ao observado para a fração

retida da membrana de poliétersulfona de 500 kDa a 1,5 bar, tendo em vista que a Figura 4.14 indicou baixa concentração de proteínas de envelope de Zika vírus na alimentação para pressão de operação igual a 1,5 bar.

### **4.3.3 Análise comparativa entre a retenção de VLPs de Zika vírus pelas membranas de PES (500 kDa) e RC (100 kDa) a 1,5 bar**

Esta etapa teve como objetivo em gerar dados complementares (à seção 4.3.1) de desempenho de separação de partículas pseudovirais de Zika pelas membranas de poliétersulfona de 500 kDa e celulose regenerada de 100 kDa. Os fluxos de permeado mostraram comportamento semelhante ao observado anteriormente na Figura 4.8, atingindo um fluxo mínimo de permeado, sendo que os valores médios para os últimos pontos de coleta experimental ( $n = 3$ ) são mostrados na Tabela 4.8.

Tabela 4.8: Resultados de desempenho das ultrafiltrações em PES de 500 kDa e em RC de 100 kDa a 1,5 bar.

Descrição	Fluxo mínimo ( $\times 10^{-6} \frac{m^3}{m^2 \cdot s}$ )	Resistência ( $\times 10^6 \frac{m^2 \cdot s}{m^3}$ )
PES 500 kDa	$5,61 \pm 0,76$	$0,18 \pm 0,024$
RC 100 kDa	$6,41 \pm 1,07$	$0,16 \pm 0,026$

Apesar de os valores de resistência, considerando os desvios experimentais, serem equivalente, os valores médios de resistência à filtração indicam uma tendência de maior incrustação na membrana de poliétersulfona.

Adicionalmente, para fatores de concentração volumétricos iguais a 6,17 (PES 500 kDa) e 5,91 (RC 100 kDa), não houve significativa alteração dos valores de fluxos finais com a redução de pressão de operação, confirmando a hipótese inicial de que resistências adicionais estejam limitando o transporte convectivo das proteínas através da membrana.

Assim, foi realizado o procedimento de *immunoblot* para aferir a permeação de VLPs pelas membranas avaliadas, sendo os resultados mostrados na Figura 4.20.

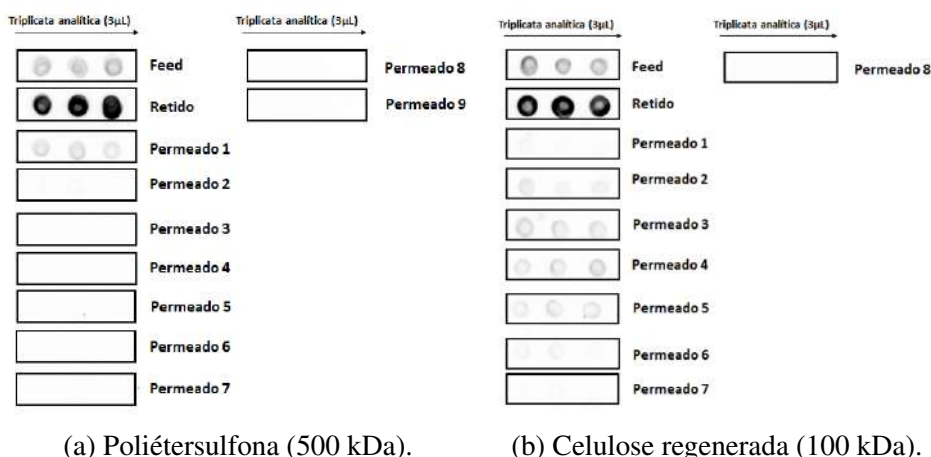


Figura 4.20: Ensaio de *Dot Blot* para frações das ultrafiltrações em PES de 500 kDa e em RC de 100 kDa a 1,5 bar.

A metodologia de Bradford e de densitometria foram aplicadas para determinar os fatores de rejeição nas membranas empregadas, sendo os resultados descritos nas Tabelas 4.9 e 4.10.

Tabela 4.9: Concentrações de proteínas totais para frações recolhidas em ultrafiltrações em PES de 500 kDa e RC de 100 kDa a 1,5 bar, em triplicata analítica. (Ajuste linear<sub>PES</sub> :  $R^2 = 0,99164^*$ ,  $p < 0,05$ ; Ajuste linear<sub>RC</sub> :  $R^2 = 0,94788^*$ ,  $p < 0,05$ ). Valores amostrais dados no Apêndice B.5.

Descrição	PES 500 kDa ( $\mu\text{g/mL}$ )	RC 100 kDa ( $\mu\text{g/mL}$ )
Alimentação	$96,72 \pm 13,31$	$67,95 \pm 2,41$
Fração retida	$246,17 \pm 43,23$	$179,28 \pm 16,06$

Tabela 4.10: Concentrações de proteínas de envelope de Zika para frações recolhidas em ultrafiltrações em PES de 500 kDa e RC de 100 kDa a 1,5 bar, em triplicata analítica. (Ajuste linear:  $R^2 = 0,98842^*$ ,  $p < 0,05$ ). Valores amostrais dados no Apêndice B.6.

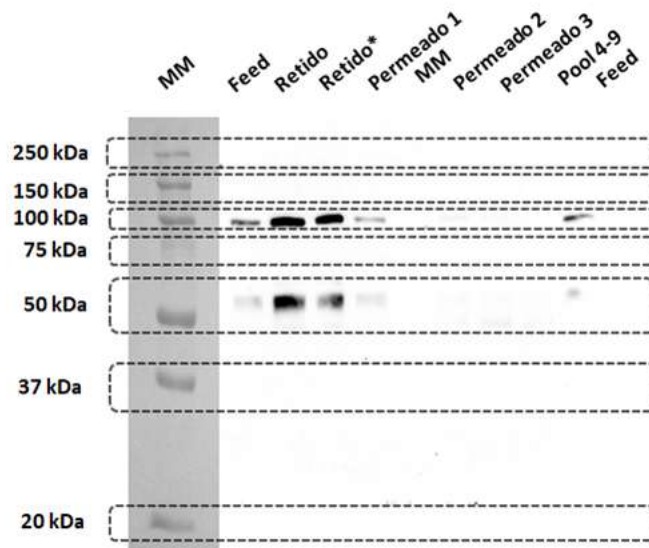
Descrição	PES 500 kDa ( $\mu\text{g/mL}$ )	RC 100 kDa ( $\mu\text{g/mL}$ )
Alimentação	$3,63 \pm 5,81$	$3,54 \pm 3,81$
Fração retida	$65,71 \pm 17,86$	$31,66 \pm 31,36$

Apesar do ajuste linear da técnica de densitometria utilizada na Tabela 4.10 apresentar significância estatística, os valores calculados a partir do nível de significância de 95 % da

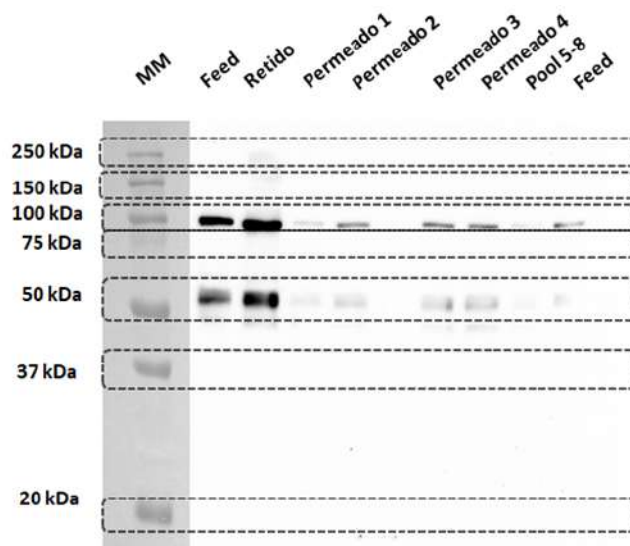
distribuição *t-sudent* não podem ser considerados estatisticamente válidos tendo em vista o valor de desvio ser superior à média. Assim, o cálculo do fator de rejeição também não representaria medida de adequado grau de reprodutibilidade da amostra analisada.

Dessa forma, a análise foi complementada com análises de *Western blot* e seus resultados são dados na página seguinte, por meio da Figura 4.21. Assim, os resultados obtidos por *Western blot* corroboraram as informações obtidas por *immunoblot*, que mostrava maiores sinais para as amostras permeadas através da membrana de celulose regenerada (100 kDa) do que da membrana de poliétersulfona (500 kDa).

De forma contrária ao esperado, a redução do *cut-off* nominal reduziu a capacidade de retenção das VLPs de Zika vírus pelo sistema. Segundo ALELE e ULBRICHT (2016), a membrana de poliétersulfona, em valores de pH superiores a 6, apresenta-se mais negativamente carregada que a membrana de celulose regenerada, sendo, portanto, menos susceptível ao *fouling*. Contudo, as informações obtidas nos ensaios anteriores fornecem indicativo de que a membrana de poliétersulfona empregada neste estudo pode conter menor caráter hidrofílico e, conseqüentemente, estar mais sujeita à incrustação por adsorção de proteínas presentes no meio de cultivo. Desta forma, uma camada dinâmica de filtração pode se formar na superfície da membrana de PES, contribuindo para reter as VLPs de forma mais eficiente.



(a) UF em poliétersulfona (500 kDa).



(b) UF em celulose regenerada (100 kDa).

Figura 4.21: Ensaio de *Western blot* para frações das ultrafiltrações em PES de 500 kDa e em RC de 100 kDa a 1,5 bar (revelação por peroxidase/D-HRP). MM: Marcador de massa molecular (Precision Plus Protein<sup>TM</sup> Dual Color Standards, Bio-Rad, EUA); *Feed*: Alimentação contendo VLPs de Zika; *Retido\**: massa de proteínas totais igual a contida na coluna de *Feed*; *Pool*: Mistura de mesma proporção das frações permeadas descritas. Para ambas figuras, houve a sobreposição das imagens colorimétricas e de quimiluminescência por programa de edição gráfica.

De modo a complementar as análises realizadas, as amostras foram submetidas ao HPLC/SEC-UV, a partir do qual se obtiveram os cromatogramas mostrados nas Figuras 4.22, 4.23 e 4.24.



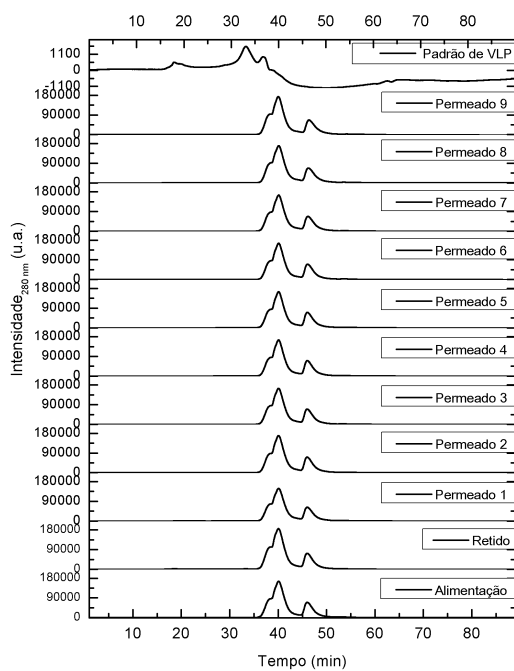
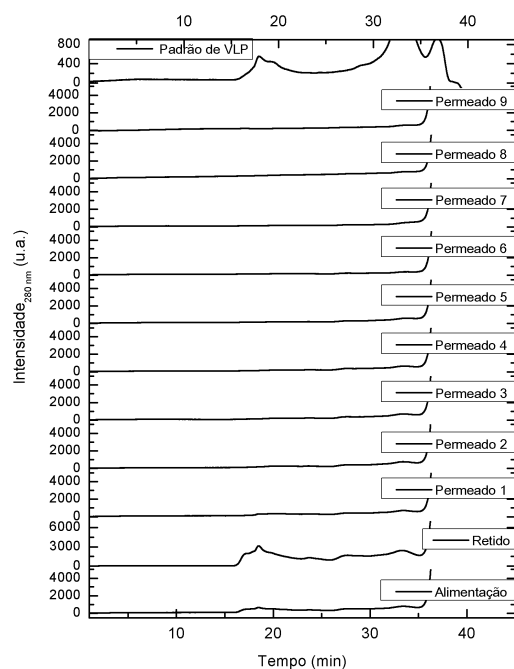


Figura 4.22: Cromatogramas das frações da ultrafiltração em PES de 500 kDa a 1,5 bar injetadas em sistema HPLC/SEC-UV: alimentação, fração retida, frações permeadas e padrão de VLP de Zika (produção *in-house*).

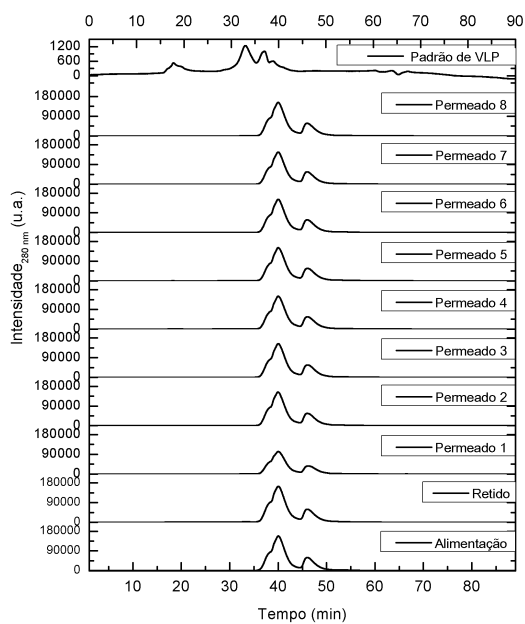
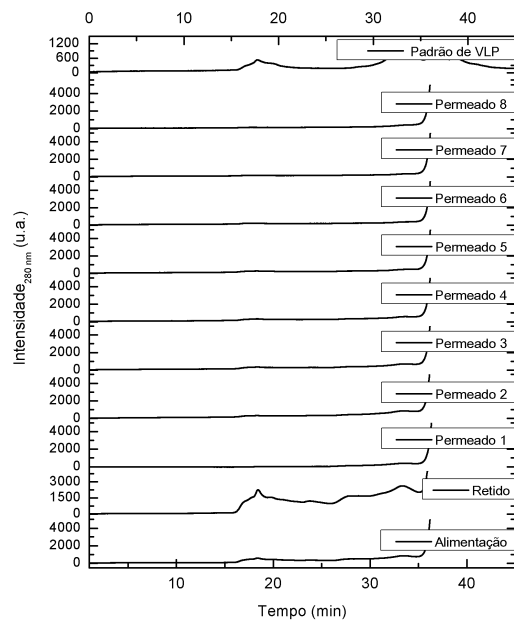
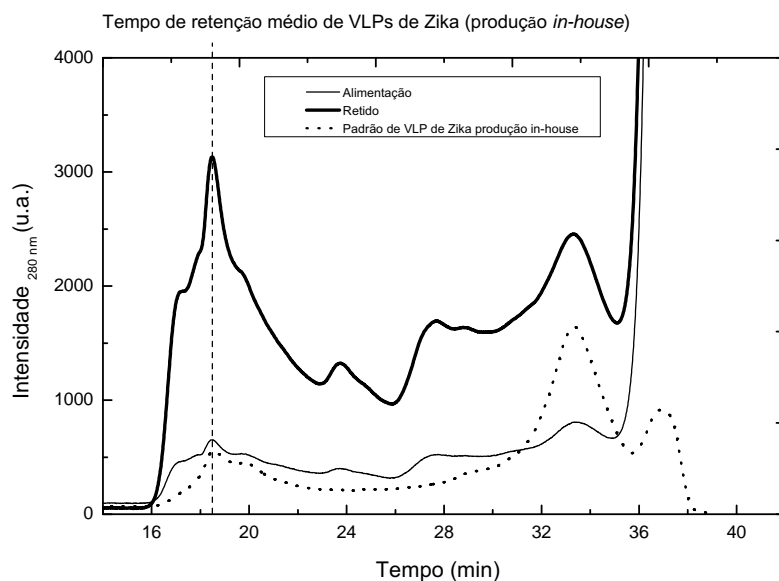
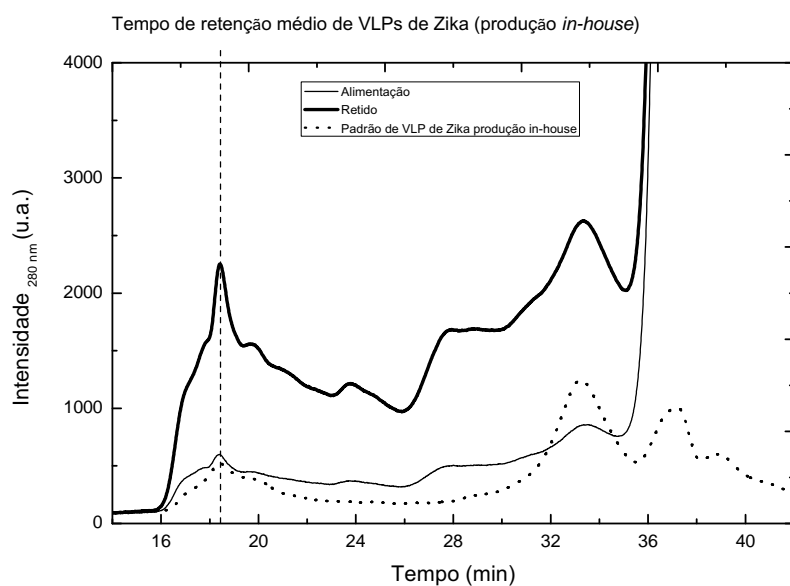


Figura 4.23: Cromatogramas das frações da ultrafiltração em RC de 100 kDa a 1,5 bar injetadas em sistema HPLC/SEC-UV: alimentação, fração retida, frações permeadas e padrão de VLP de Zika (produção *in-house*).



(a) Ultrafiltração em PES de 500 kDa: alimentação, fração retida e padrão de VLP de Zika (produção *in-house*).



(b) Ultrafiltração em RC de 100 kDa: alimentação, fração retida e padrão de VLP de Zika (produção *in-house*).

Figura 4.24: Cromatogramas, com ênfase no tempo de retenção das VLPs de Zika, das frações da ultrafiltração a 1,5 bar em PES de 500 kDa e RC de 100 kDa injetadas em sistema HPLC/SEC-UV.

Confirmou-se, com auxílio das Figuras 4.22, 4.23 e 4.24, a capacidade de concentração de partículas pseudovirais de Zika vírus pelo sistema de ultrafiltração empregando membranas de poliétersulfona de 500 kDa e celulose regenerada de 100 kDa. O melhor

efeito de concentração foi obtido para a membrana de PES, tendo em vista as perdas de VLPs pelas frações permeadas constatadas nos ensaios de *immunoblot* e *Western blot*. Adicionalmente, não foram constatadas variações substanciais de desempenho a partir da redução da pressão de operação, devido a limitações do transporte convectivo após os instantes iniciais da operação.

# Capítulo 5

## Conclusões e Sugestões

### 5.1 Conclusões

Este trabalho avaliou a capacidade de concentração de partículas pseudovirais de Zika vírus por meio de processos com membranas, que são caracterizados por biocompatibilidade e fácil escalonamento.

Estudos iniciais empregando membrana de poliétersulfona com massas moleculares nominais de corte de 300 kDa e 1000 kDa indicaram que o menor *cut-off* seria mais adequado para o processo de concentração em estudo.

Subsequentemente, análises em célula de ultrafiltração agitada Amicon® com capacidade para até 400 mL foram realizadas utilizando membranas de poliétersulfona de 500 kDa e celulose regenerada de 100 kDa. Apesar de ambos sistemas apresentarem capacidade de concentração de proteínas de envelope de Zika, a membrana de celulose regenerada apresentou maior perda do produto de interesse nas frações permeadas. Para ambas membranas, limitações do transporte convectivo pela matriz porosa foram observadas devido ao estabelecimento de fluxo mínimo após 17 minutos de operação.

Assim, estudos comparativos com a membrana de poliétersulfona de 500 kDa com variações da pressão de operação (2 bar e 1,5 bar) permitiram inferir que a limitação ao transporte se dá por resistências adicionais ao sistema de separação, não sendo influenciada substancialmente pela pressão de trabalho.

Portanto, estudos complementares foram realizados com as alíquotas retidas e alimen-

tadas em membranas de PES (500 kDa) e RC (100 kDa) em equipamento de HPLC/SEC-UV. Observou-se por HPLC/SEC-UV, a concentração de proteínas com o mesmo tempo de retenção de VLPs purificadas de Zika vírus (produção *in-house*).

## 5.2 Sugestões para trabalhos futuros

Tendo em vista a limitação do tempo de trabalho experimental, sugerem-se a seguir algumas alternativas para investigar efeitos não contemplados neste trabalho.

1. Avaliar a redução da pressão de operação para 1 bar e constatar o efeito na permeação de VLPs nos instantes iniciais de fluxo de permeado na filtração *dead-end*.
2. Estudar condições de agitação na filtração *dead-end* de modo a estabelecer condições ótimas de fluxo de permeado, ao reduzir o depósito de materiais na superfície da membrana e favorecer as condições convectivas de transporte. Contudo, segundo a literatura, a tensão de cisalhamento pode contribuir para a mudança estrutural das proteínas. Dessa forma, este parâmetro deve ser considerado de modo a não prejudicar os sítios de ligação do *loop* de fusão das VLPs.
3. Estabelecer valores de pressão de operação e tensão de cisalhamento, através de um planejamento de experimentos, e avaliar os efeitos na retenção de partículas pseudovirais de Zika vírus a partir de módulo de filtração tangencial empregando fibras ocas. De forma adicional, avaliar possíveis variações estruturais no arranjo tridimensional das VLPs através de técnicas tais como difração circular, conforme também já descrito na literatura para proteínas globulares.

# Referências Bibliográficas

- ABBAS, A., LICHTMAN, A., PILLAI, S., 2015, *Imunologia Celular e Molecular*. Rio de Janeiro, Elsevier Brasil. ISBN: 9788535283204.
- ALELE, N., ULBRICHT, M., 2016, “Membrane-based purification of proteins from nanoparticle dispersions: Influences of membrane type and ultrafiltration conditions”, *Separation and Purification Technology*, v. 158, pp. 171 – 182. ISSN: 1383-5866. doi: <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2015.11.031>. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383586615303543>>.
- ALVIM, R. G., ITABAIANA, J., CASTILHO, L. R., 2019, “Zika virus-like particles (VLPs): stable cell line and continuous perfusion process as a new potential vaccine manufacturing process.” *Vaccine*. Submetido em Dezembro de 2018.
- BAKER, R. W., 2004, *Membrane technology and applications*. Inglaterra, John Wiley and Sons Ltd. ISBN: 0-470-85445-6.
- BALDASSO, C., BARROS, T., TESSARO, I., 2011, “Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration”, *Desalination*, v. 278, n. 1, pp. 381 – 386. ISSN: 0011-9164. doi: <https://doi.org/10.1016/j.desal.2011.05.055>. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0011916411004681>>.
- BASILE, K., KOK, J., DWYER, D. E., 2017, “Zika virus: what, where from and where to?” *Pathology*, v. 49, n. 7, pp. 698 – 706. ISSN: 0031-3025. doi: <https://doi.org/10.1016/j.pathol.2017.08.002>. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S003130251730082X>>.
- BASU, R., ZHAI, L., CONTRERAS, A., et al., 2018, “Immunization with phage virus-like particles displaying Zika virus potential B-cell epitopes neutralizes Zika virus infection of monkey kidney cells”, *Vaccine*, v. 36, n. 10, pp. 1256 – 1264. ISSN: 0264-410X. doi: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.01.056>. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X18301166>>.

- BERK, J., BERK, S., 2000, “Chapter 11 - ANOVA, Taguchi, and Other Design of Experiments Techniques: Finding needles in haystacks...”. In: Berk, J., Berk, S. (Eds.), *Quality Management for the Technology Sector*, Butterworth-Heinemann, pp. 106 – 123, Woburn. ISBN: 978-0-7506-7316-7. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-075067316-7/50011-5>. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780750673167500115>>.
- BOGOCH, I. I., BRADY, O. J., KRAEMER, M. U. G., et al., 2016, “Anticipating the international spread of Zika virus from Brazil”, *The Lancet*, v. 387, n. 10016, pp. 335 – 336. ISSN: 0140-6736. doi: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00080-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00080-5). Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673616000805>>.
- BOIGARD, H., ALIMOVA, A., MARTIN, G. R., et al., 2017, “Zika virus-like particle (VLP) based vaccine”, *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 11, n. 5 (05), pp. 1–20. doi: 10.1371/journal.pntd.0005608. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005608>>.
- BRADFORD, M. M., 1976, “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding”, *Analytical Biochemistry*, v. 72, n. 1, pp. 248 – 254. ISSN: 0003-2697. doi: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3). Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003269776905273>>.
- CHARCOSSET, C., 2006, “Membrane processes in biotechnology: An overview”, *Biotechnology Advances*, v. 24, n. 5, pp. 482 – 492. ISSN: 0734-9750. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.03.002>. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975006000425>>.
- CHEREMISINOFF, N. P., 2002, “Chapter 9 - Membrane Separation Technologies”. In: Cheremisinoff, N. P. (Ed.), *Handbook of Water and Wastewater Treatment Technologies*, Butterworth-Heinemann, pp. 335 – 371, Woburn. ISBN: 978-0-7506-7498-0. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-075067498-0/50012-7>. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780750674980500127>>.
- CHONG, M. K., CHUA, A. J. S., TAN, T. T. T., et al., 2014, “Microscopy techniques in flavivirus research”, *Micron*, v. 59, pp. 33 – 43. ISSN: 0968-4328. doi: <https://doi.org/10.1016/j.micron.2013.12.006>. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968432813002011>>.



- CHUAN, Y. P., WIBOWO, N., LUA, L. H., et al., 2014, “The economics of virus-like particle and capsomere vaccines”, *Biochemical Engineering Journal*, v. 90, pp. 255 – 263. ISSN: 1369-703X. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2014.06.005>. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369703X14001570>>.
- CRAMER, S. M., HOLSTEIN, M. A., 2011, “Downstream bioprocessing: recent advances and future promise”, *Current Opinion in Chemical Engineering*, v. 1, n. 1, pp. 27 – 37. ISSN: 2211-3398. doi: <https://doi.org/10.1016/j.coche.2011.08.008>. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S221133981100013X>>. Open issue 1/1.
- DA SILVA MADEIRA, L., BORSCHIVER, S., PEREIRA JR, N., 2012, “Prospects and Trends in the Brazilian Market for Biologically Sourced Products”, *Journal of technology management and innovation*, v. 7 (10), pp. 44 – 56. ISSN: 0718-2724. Disponível em: <[https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0718-27242012000300005&nrm=iso](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-27242012000300005&nrm=iso)>.
- DYE, C., 2014, “After 2015: infectious diseases in a new era of health and development”, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, v. 369, n. 1645. ISSN: 0962-8436. doi: 10.1098/rstb.2013.0426. Disponível em: <<http://rstb.royalsocietypublishing.org/content/369/1645/20130426>>.
- EMAMI, P., MOTEVALIAN, S. P., PEPIN, E., et al., 2018, “Impact of module geometry on the ultrafiltration behavior of capsular polysaccharides for vaccines”, *Journal of Membrane Science*, v. 561, pp. 19 – 25. ISSN: 0376-7388. doi: <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2018.05.024>. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0376738818301716>>.
- EYKAMP, W., 1995, “Chapter 1 Microfiltration and ultrafiltration”. In: Noble, R. D., Stern, S. A. (Eds.), *Membrane Separations Technology*, v. 2, *Membrane Science and Technology*, Elsevier, pp. 1 – 43. doi: [https://doi.org/10.1016/S0927-5193\(06\)80003-3](https://doi.org/10.1016/S0927-5193(06)80003-3). Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927519306800033>>.
- FRIETZE, K. M., PEABODY, D. S., CHACKERIAN, B., 2016, “Engineering virus-like particles as vaccine platforms”, *Current Opinion in Virology*, v. 18, pp. 44 – 49. ISSN: 1879-6257. doi: <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2016.03.001>. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1879625716300165>>. Antiviral strategies • Virus structure and expression.

- FUENMAYOR, J., GÒDIA, F., CERVERA, L., 2017, “Production of virus-like particles for vaccines”, *New Biotechnology*, v. 39, pp. 174 – 180. ISSN: 1871-6784. doi: <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2017.07.010>. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1871678416325511>>. European Congress of Biotechnology - ECB 2016.
- GALLO-OLLER, G., ORDOÑEZ, R., DOTOR, J., 2018, “A new background subtraction method for Western blot densitometry band quantification through image analysis software”, *Journal of Immunological Methods*, v. 457, pp. 1 – 5. ISSN: 0022-1759. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jim.2018.03.004>. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022175918300371>>.
- GALÁN-HUERTA, K., RIVAS-ESTILLA, A., MARTINEZ-LANDEROS, E., et al., 2016, “The Zika virus disease: An overview”, *Medicina Universitaria*, v. 18, n. 71, pp. 115 – 124. ISSN: 1665-5796. doi: <https://doi.org/10.1016/j.rmu.2016.05.003>. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1665579616300588>>.
- GHOSH, R., GILDA, J. E., GOMES, A. V., 2014, “The necessity of and strategies for improving confidence in the accuracy of western blots”, *Expert Review of Proteomics*, v. 11, n. 5, pp. 549–560. doi: 10.1586/14789450.2014.939635. Disponível em: <<https://doi.org/10.1586/14789450.2014.939635>>.
- GOTTSCHALK, U., 2011, “The future of downstream processing”, *Pharmaceutical Technology*. Disponível em: <<http://link-galegroup.ez29.capes.proxy.ufrj.br/apps/doc/A259840904/AONE?u=capes&sid=AONE&xid=eec3e06b>>. Acessado em 09/01/2019.
- GOURLEY, L., BRITTEN, M., GAUTHIER, S., et al., 1994, “Characterization of adsorptive fouling on ultrafiltration membranes by peptides mixtures using contact angle measurements”, *Journal of Membrane Science*, v. 97, pp. 283 – 289. ISSN: 0376-7388. doi: [https://doi.org/10.1016/0376-7388\(94\)00172-U](https://doi.org/10.1016/0376-7388(94)00172-U). Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/037673889400172U>>.
- GROSS, J., SAYLE, S., KAROW, A. R., et al., 2016, “Nanoparticle tracking analysis of particle size and concentration detection in suspensions of polymer and protein samples: Influence of experimental and data evaluation parameters”, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 104, pp. 30 – 41. ISSN: 0939-6411. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.04.013>. Dis-

ponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0939641116301370>>.

GRZENIA, D. L., CARLSON, J. O., WICKRAMASINGHE, S. R., 2008, “Tangential flow filtration for virus purification”, *Journal of Membrane Science*, v. 321, n. 2, pp. 373 – 380. ISSN: 0376-7388. doi: <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2008.05.020>. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0376738808004626>>.

HABERT, A. C., BORGES, C. P., NOBREGA, R., 2006, *Processos de Separação por Membranas*. Rio de Janeiro, E-papers Serviços Editoriais Ltda. ISBN: 85-7650-085-X.

HANKE, A. T., OTTENS, M., 2014, “Purifying biopharmaceuticals: knowledge-based chromatographic process development”, *Trends in Biotechnology*, v. 32, n. 4, pp. 210 – 220. ISSN: 0167-7799. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2014.02.001>. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167779914000195>>.

HEINZ, F., STIASNY, K., 2012, “Flaviviruses and their antigenic structure”, *Journal of Clinical Virology*, v. 55, n. 4, pp. 289 – 295. ISSN: 1386-6532. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2012.08.024>. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1386653212003435>>.

HENNESSEY, M., FISCHER, M., STAPLES, J. E., 2016, “Zika virus spreads to new areas—region of the Americas, May 2015–January 2016”, *American Journal of Transplantation*, v. 16, n. 3, pp. 1031–1034.

HIETPAS, J., MCMULLAN, L. K., HANSON, H. L., et al., 2005, “{CHAPTER} 4 - Keeping Track of Viruses”. In: Breeze, R. G., Budowle, B., Schutzer, S. E. (Eds.), *Microbial Forensics*, Academic Press, pp. 55 – 97, Burlington. ISBN: 978-0-12-088483-4. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-012088483-4/50007-X>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012088483450007X>>.

HUANG, H.-L., YANG, S., 2006, “Filtration characteristics of polysulfone membrane filters”, *Journal of Aerosol Science*, v. 37, n. 10, pp. 1198 – 1208. ISSN: 0021-8502. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jaerosci.2005.11.010>. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021850205002314>>.

HUISMAN, I. H., PRÁDANOS, P., HERNÁNDEZ, A., 2000, “The effect of protein–protein and protein–membrane interactions on membrane fouling in ul-

trafiltration”, *Journal of Membrane Science*, v. 179, n. 1, pp. 79 – 90. ISSN: 0376-7388. doi: [https://doi.org/10.1016/S0376-7388\(00\)00501-9](https://doi.org/10.1016/S0376-7388(00)00501-9). Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0376738800005019>>.

ICTV, 2018, *International Committee of Taxonomy of Viruses (ICTV)*. Webpage, International Committee of Taxonomy of Viruses (ICTV). Disponível em: <<https://talk.ictvonline.org/>>. Acessado em 19/03/2018.

JAN, E., TAO, Y. J., 2015, “Editorial overview: Virus structure and expression”, *Current Opinion in Virology*, v. 12, pp. ix – x. ISSN: 1879-6257. doi: <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.05.005>. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1879625715000759>>. Antiviral strategies • Virus structure and expression.

JI, J., LIU, F., HASHIM, N. A., et al., 2015, “Poly(vinylidene fluoride) (PVDF) membranes for fluid separation”, *Reactive and Functional Polymers*, v. 86, pp. 134 – 153. ISSN: 1381-5148. doi: <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2014.09.023>. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1381514814002028>>.

JIANG, Y.-D., ZHANG, J.-H., XIE, S.-M., et al., 2010, “Chiral separation of D,L-tyrosine through nitrocellulose membrane”, *Journal of Applied Polymer Science*, v. 124, n. 6, pp. 5187–5193. doi: 10.1002/app.33929. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/app.33929>>.

JOZALA, A. F., GERALDES, D. C., TUNDISI, L. L., et al., 2016, “Biopharmaceuticals from microorganisms: from production to purification”, *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 47 (dec), pp. 51–63. doi: 10.1016/j.bjm.2016.10.007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.007>>.

JUNGBAUER, A., 2013, “Continuous downstream processing of biopharmaceuticals”, *Trends in Biotechnology*, v. 31, n. 8, pp. 479 – 492. ISSN: 0167-7799. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.05.011>. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167779913001200>>.

KINCH, M. S., 2015, “An overview of FDA-approved biologics medicines”, *Drug Discovery Today*, v. 20, n. 4, pp. 393 – 398. ISSN: 1359-6446. doi: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.09.003>. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S135964461400350X>>.

KINCH, M. S., GRIESENAUER, R. H., 2018, “2017 in review: FDA approvals of new molecular entities”, *Drug Discovery Today*, v. 23, n. 8, pp. 1469 – 1473.

ISSN: 1359-6446. doi: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.05.011>. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359644618300886>>.

KNUUTILA, H., HESSEN, E. T., KIM, I., et al., 2010, “Vapor–liquid equilibrium in the sodium carbonate–sodium bicarbonate–water–CO<sub>2</sub>-system”, *Chemical Engineering Science*, v. 65, n. 6, pp. 2218 – 2226. ISSN: 0009-2509. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ces.2009.12.024>. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009250909008690>>.

KRAUER, F., RIESEN, M., REVEIZ, L., et al., 2017, “Zika Virus Infection as a Cause of Congenital Brain Abnormalities and Guillain–Barré Syndrome: Systematic Review”, *PLOS Medicine*, v. 14, n. 1 (01), pp. 1–27. doi: 10.1371/journal.pmed.1002203. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002203>>.

LI, L., LOK, S.-M., YU, I.-M., et al., 2008, “The Flavivirus Precursor Membrane-Envelope Protein Complex: Structure and Maturation”, *Science*, v. 319, n. 5871, pp. 1830–1834. ISSN: 0036-8075. doi: 10.1126/science.1153263. Disponível em: <<http://science.sciencemag.org/content/319/5871/1830>>.

LI, M., QIU, Y. X., 2013, “A review on current downstream bio-processing technology of vaccine products”, *Vaccine*, v. 31, n. 9, pp. 1264 – 1267. ISSN: 0264-410X. doi: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.12.056>. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X12018439>>.

LIMA, T. M., SOUZA, M. O., CASTILHO, L. R., 2019, “Purification of Flavivirus VLPs by a two-step chromatographic process”, *Vaccine*. Submetido em Dezembro de 2018.

LIN, H.-H., YIP, B.-S., HUANG, L.-M., et al., 2018, “Zika virus structural biology and progress in vaccine development”, *Biotechnology Advances*, v. 36, n. 1, pp. 47 – 53. ISSN: 0734-9750. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.09.004>. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975017301155>>.

LIN, S.-H., HUNG, C.-L., JUANG, R.-S., 2008, “Applicability of the exponential time dependence of flux decline during dead-end ultrafiltration of binary protein solutions”, *Chemical Engineering Journal*, v. 145, n. 2, pp. 211 –

217. ISSN: 1385-8947. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2008.04.003>. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1385894708002003>>.

LOJEWSKA, E., KOWALCZYK, T., OLEJNICZAK, S., et al., 2016, “Extraction and purification methods in downstream processing of plant-based recombinant proteins”, *Protein Expression and Purification*, v. 120, pp. 110 – 117. ISSN: 1046-5928. doi: <https://doi.org/10.1016/j.pep.2015.12.018>. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046592815301339>>.

LOKKO, Y., HEIJDE, M., SCHEBESTA, K., et al., 2018, “Biotechnology and the bioeconomy—Towards inclusive and sustainable industrial development”, *New Biotechnology*, v. 40, pp. 5 – 10. ISSN: 1871-6784. doi: <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2017.06.005>. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1871678416326206>>. Bioeconomy.

LU, R., ZHANG, C., PIATKOVSKY, M., et al., 2017, “Improvement of virus removal using ultrafiltration membranes modified with grafted zwitterionic polymer hydrogels”, *Water Research*, v. 116, pp. 86 – 94. ISSN: 0043-1354. doi: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.03.023>. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135417301963>>.

LUDWIG, C., WAGNER, R., 2007, “Virus-like particles—universal molecular toolboxes”, *Current Opinion in Biotechnology*, v. 18, n. 6, pp. 537 – 545. ISSN: 0958-1669. doi: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.10.013>. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958166907001462>>. Chemical biotechnology / Pharmaceutical biotechnology.

MADAENI, S., HEIDARY, F., 2011, “Improving separation capability of regenerated cellulose ultrafiltration membrane by surface modification”, *Applied Surface Science*, v. 257, n. 11, pp. 4870 – 4876. ISSN: 0169-4332. doi: <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2010.12.128>. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169433210018908>>.

MANSFIELD, K., KING, N., 1998, “Chapter 1 - Viral Diseases”. In: Bennett, B. T., Abee, C. R., Henrickson, R. (Eds.), *Nonhuman Primates in Biomedical Research*, American College of Laboratory Animal Medicine, Academic Press, pp. 1 – 57, New York. ISBN: 978-0-12-088665-4. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-012088665-4/50003-8>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780120886654500038>>.

- MARKETS, M. ., 2018. “In Vitro Diagnostic/IVD Market worth 87.93 Billion by 2023”. Disponível em: <<https://www.marketsandmarkets.com/PressReleases/ivd-in-vitro-diagnostics.asp>>.
- MAURER-STROH, S., MAK, T.-M., NG, Y.-K., et al., 2016, “South-east Asian Zika virus strain linked to cluster of cases in Singapore, August 2016”, *Eurosurveillance*, v. 21, n. 38.
- MCDONOUGH, A. A., VEIRAS, L. C., MINAS, J. N., et al., 2015, “Considerations when quantitating protein abundance by immunoblot”, *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, v. 308, n. 6, pp. C426–C433. doi: 10.1152/ajpcell.00400.2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00400.2014>>. PMID: 25540176.
- MEHTA, A., ZYDNEY, A. L., 2005, “Permeability and selectivity analysis for ultrafiltration membranes”, *Journal of Membrane Science*, v. 249, n. 1, pp. 245 – 249. ISSN: 0376-7388. doi: <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2004.09.040>. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0376738804007021>>.
- METZ, S. W., THOMAS, A., WHITE, L., et al., 2018, “Dengue virus-like particles mimic the antigenic properties of the infectious dengue virus envelope”, *Virology Journal*, v. 15, n. 1, pp. 60. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12985-018-0970-2>>.
- MÄNTTÄRI, M., VIITIKKO, K., NYSTRÖM, M., 2006, “Nanofiltration of biologically treated effluents from the pulp and paper industry”, *Journal of Membrane Science*, v. 272, n. 1, pp. 152 – 160. ISSN: 0376-7388. doi: <https://doi.proxy.ufrj.br/10.1016/j.memsci.2005.07.031>. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0376738805005740>>.
- MORAES, Â., CASTILHO, L. R., AUGUSTO, E. F. P., 2008, *Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos a terapia gênica*. São Paulo, Roca. ISBN: 9788572417303.
- MULDER, M., 1995, “Chapter 2 Polarization phenomena and membrane fouling”. In: Noble, R. D., Stern, S. A. (Eds.), *Membrane Separations Technology*, v. 2, *Membrane Science and Technology*, Elsevier, pp. 45 – 84. doi: [https://doi.org/10.1016/S0927-5193\(06\)80004-5](https://doi.org/10.1016/S0927-5193(06)80004-5). Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927519306800045>>.
- MUNDLE, S. T., GIEL-MOLONEY, M., KLEANTHOUS, H., et al., 2015, “Preparation of pure, high titer, pseudoinfectious Flavivirus particles by hollow fiber tan-

- gential flow filtration and anion exchange chromatography”, *Vaccine*, v. 33, n. 35, pp. 4255 – 4260. ISSN: 0264-410X. doi: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.09.074>. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X14016168>>. Vaccine Technology V.
- NAKAMURA, K., TANAKA, T., TAKEO, K., 1989, “Characterization of protein binding to a nitrocellulose membrane”, *SEIBUTSU BUTSURI KAGAKU*, v. 33, n. 6, pp. 293–303. doi: 10.2198/sbk.33.293.
- NAYAK, D. P., 2000, “3 - Virus Morphology, Replication, and Assembly”. In: Hurst, C. J. (Ed.), *Viral Ecology*, Academic Press, pp. 63 – 124, San Diego. ISBN: 978-0-12-362675-2. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-012362675-2/50004-5>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123626752500045>>.
- NEGRETE, A., PAI, A., SHILOACH, J., 2014, “Use of hollow fiber tangential flow filtration for the recovery and concentration of HIV virus-like particles produced in insect cells”, *Journal of Virological Methods*, v. 195, pp. 240 – 246. ISSN: 0166-0934. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.10.017>. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166093413004217>>.
- NOAD, R., ROY, P., 2003, “Virus-like particles as immunogens”, *Trends in Microbiology*, v. 11, n. 9, pp. 438 – 444. ISSN: 0966-842X. doi: [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(03\)00208-7](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(03)00208-7). Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0966842X03002087>>.
- NONVIGNON, J., ATHERLY, D., PECENKA, C., et al., 2018, “Cost-effectiveness of rotavirus vaccination in Ghana: Examining impacts from 2012 to 2031”, *Vaccine*, v. 36, n. 47, pp. 7215 – 7221. ISSN: 0264-410X. doi: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.11.080>. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X17317231>>. Impact and Effectiveness of Rotavirus Vaccines in Africa.
- NYSTRÖM, M., AIMAR, P., LUQUE, S., et al., 1998, “Fractionation of model proteins using their physicochemical properties”, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 138, n. 2, pp. 185 – 205. ISSN: 0927-7757. doi: [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(96\)03892-7](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(96)03892-7). Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927775796038927>>.
- PARR, M. K., MONTACIR, O., MONTACIR, H., 2016, “Physicochemical characterization of biopharmaceuticals”, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical*



*Analysis*, v. 130, pp. 366 – 389. ISSN: 0731-7085. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.05.028>. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708516302679>>. Review Issue 2016.

PIERSON, T. C., KIELIAN, M., 2013, “Flaviviruses: braking the entering”, *Current Opinion in Virology*, v. 3, n. 1, pp. 3 – 12. ISSN: 1879-6257. doi: <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2012.12.001>. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1879625712001897>>. Virus entry / Environmental virology.

POLAND, G. A., KENNEDY, R. B., OVSYANNIKOVA, I. G., et al., 2018, “Development of vaccines against Zika virus”, *The Lancet Infectious Diseases*, v. 18, n. 7, pp. e211 – e219. ISSN: 1473-3099. doi: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30063-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30063-X). Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S147330991830063X>>.

PURDY, D. E., CHANG, G.-J. J., 2005, “Secretion of noninfectious dengue virus-like particles and identification of amino acids in the stem region involved in intracellular retention of envelope protein”, *Virology*, v. 333, n. 2, pp. 239 – 250. ISSN: 0042-6822. doi: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.12.036>. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682204008402>>.

QI, K., HUANG, R., 1998, “3 - Polyethersulfone (PES) and Its Processing”. In: Cheremisinoff, N. P. (Ed.), *Advanced Polymer Processing Operations*, William Andrew Publishing, pp. 69 – 99, Westwood, NJ. ISBN: 978-0-8155-1426-8. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-081551426-8.50006-4>. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780815514268500064>>.

RIBEIRO, L. S., MARQUES, R. E., DE JESUS, A. M. R., et al., 2016, “Zika crisis in Brazil: challenges in research and development”, *Current Opinion in Virology*, v. 18, pp. 76 – 81. ISSN: 1879-6257. doi: <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2016.04.002>. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S187962571630044X>>. Antiviral strategies • Virus structure and expression.

RODRÍGUEZ-LIMAS, W. A., SEKAR, K., TYO, K. E., 2013, “Virus-like particles: the future of microbial factories and cell-free systems as platforms for vaccine development”, *Current Opinion in Biotechnology*, v. 24, n. 6, pp. 1089 – 1093. ISSN: 0958-1669. doi: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.02.008>. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/>

S0958166913000220>. Chemical biotechnology • Pharmaceutical biotechnology.

RODRIGUEZ, F., COHEN, C., OBER, C., et al., 2014, *Principles of Polymer Systems, Sixth Edition*. Boca Raton, CRC Press. ISBN: 9781482223798. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=si3cBQAAQBAJ>>.

ROSLAN, J., KAMAL, S. M. M., YUNOS, K. F. M., et al., 2018, “Evaluation on performance of dead-end ultrafiltration membrane in fractionating tilapia by-product protein hydrolysate”, *Separation and Purification Technology*, v. 195, pp. 21 – 29. ISSN: 1383-5866. doi: <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2017.11.020>. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383586617319949>>.

SCHWAAB, M., PINTO, J. C., 2007, *Análise de dados experimentais, I: fundamentos de estatística e estimação de parâmetros*. Rio de Janeiro, E-papers. ISBN: 8576501368.

SCOTT, K., 1995, “MEMBRANE MATERIALS, PREPARATION AND CHARACTERISATION”. In: Scott, K. (Ed.), *Handbook of Industrial Membranes*, Elsevier Science, pp. 187 – 269, Amsterdam. ISBN: 978-1-85617-233-2. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-185617233-2/50005-2>. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781856172332500052>>.

SINGH, R., 2014, *Membrane Technology and Engineering for Water Purification: Application, Systems Design and Operation*. Waltham, Elsevier Science. ISBN: 9780444634092. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=GoFzAwAAQBAJ>>.

SMITH, J., LIPSITCH, M., ALMOND, J. W., 2011, “Vaccine production, distribution, access, and uptake”, *The Lancet*, v. 378, n. 9789, pp. 428 – 438. ISSN: 0140-6736. doi: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60478-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60478-9). Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673611604789>>.

STADE, S., KALLIOINEN, M., MIKKOLA, A., et al., 2013, “Reversible and irreversible compaction of ultrafiltration membranes”, *Separation and Purification Technology*, v. 118, pp. 127 – 134. ISSN: 1383-5866. doi: <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2013.06.039>. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S138358661300405X>>.

- STEPHENSON, J. R., 1988, “Flavivirus vaccines”, *Vaccine*, v. 6, n. 6, pp. 471 – 480. ISSN: 0264-410X. doi: [https://doi.org/10.1016/0264-410X\(88\)90095-3](https://doi.org/10.1016/0264-410X(88)90095-3). Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X88900953>>.
- STEPPERT, P., BURGSTALLER, D., KLAUSBERGER, M., et al., 2017, “Quantification and characterization of virus-like particles by size-exclusion chromatography and nanoparticle tracking analysis”, *Journal of Chromatography A*, v. 1487, pp. 89 – 99. ISSN: 0021-9673. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.12.085>. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967316317514>>.
- SUNIM, H., 2017, *As coisas que você só vê quando desacelera*. Rio de Janeiro, Sextante. ISBN: 9788543105307.
- SUSANTO, H., FRANZKA, S., ULBRICHT, M., 2007, “Dextran fouling of polyethersulfone ultrafiltration membranes—Causes, extent and consequences”, *Journal of Membrane Science*, v. 296, n. 1, pp. 147 – 155. ISSN: 0376-7388. doi: <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2007.03.027>. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0376738807001950>>.
- SYROVÝ, I., HODNÝ, Z., 1991, “Staining and quantification of proteins separated by polyacrylamide gel electrophoresis”, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, v. 569, n. 1, pp. 175 – 196. ISSN: 0378-4347. doi: [https://doi.org/10.1016/0378-4347\(91\)80229-6](https://doi.org/10.1016/0378-4347(91)80229-6). Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378434791802296>>.
- VIRALZONE/EXPASY, 2016. “Zika virus”. Disponível em: <[http://viralzone.expasy.org/6756?outline=all\\_by\\_protein](http://viralzone.expasy.org/6756?outline=all_by_protein)>.
- WALSH, G., 2002, “Biopharmaceuticals and biotechnology medicines: an issue of nomenclature”, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 15, n. 2, pp. 135 – 138. ISSN: 0928-0987. doi: [https://doi.org/10.1016/S0928-0987\(01\)00222-6](https://doi.org/10.1016/S0928-0987(01)00222-6). Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928098701002226>>.
- WANG, S., LU, A., ZHANG, L., 2016, “Recent advances in regenerated cellulose materials”, *Progress in Polymer Science*, v. 53, pp. 169 – 206. ISSN: 0079-6700. doi: <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2015.07.003>. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S007967001500074X>>.

- WILUSZ, J., 2005, “{CHAPTER} 3 - The Fundamentals of Human Virology”. In: Breze, R. G., Budowle, B., Schutzer, S. E. (Eds.), *Microbial Forensics*, Academic Press, pp. 41 – 53, Burlington. ISBN: 978-0-12-088483-4. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-012088483-4/50006-8>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780120884834500068>>.
- YAKOB, L., WALKER, T., 2016, “Zika virus outbreak in the Americas: the need for novel mosquito control methods”, *The Lancet Global Health*, v. 4, n. 3, pp. e148 – e149. ISSN: 2214-109X. doi: [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(16\)00048-6](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(16)00048-6). Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214109X16000486>>.
- ZANLUCA, C., DOS SANTOS, C. N. D., 2016, “Zika virus – an overview”, *Microbes and Infection*, v. 18, n. 5, pp. 295 – 301. ISSN: 1286-4579. doi: <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2016.03.003>. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1286457916000496>>.
- ZHANG, Y.-H. P., SUN, J., MA, Y., 2017, “Biomanufacturing: history and perspective”, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 44, n. 4-5, pp. 773–784. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10295-016-1863-2>>.

# Apêndice A

## Autorizações de uso de imagem

Send mail to ViralZone  
(All fields are mandatory)

Your E-Mail address:

Your name:

Subject:

 All pictures in ViralZone are copyright of the SIB Swiss Institute of Bioinformatics. Permission is granted to use the pictures in academic theses or non-commercial poster/presentation, provided the source is acknowledged.

Your message:

Send a copy to yourself

(to cancel go back to previous page)

Figura A.1: Digitalização da mensagem expressa no site de origem da imagem 'Figura 2.1: Representação da estrutura do vírus Zika'.

# Apêndice B

## Informações complementares

1. Detalhamento da Figura 4.1: Uso de sobrenadante coletados nos experimentos de ultrafiltração.

- Ensaios de microfiltração: coletas dos dias 08/02/2018, 14/02/2018 e 17/02/2018.
- Ensaios de ultrafiltração em membrana de PES de 300 kDa: coletas dos dias 08/02/2018, 14/02/2018 e 17/02/2018.
- Ensaios de ultrafiltração em membrana de PES de 1000 kDa: coletas dos dias 17/02/2018 e 19/02/2018.
- Ensaios de ultrafiltração em membrana de PES de 500 kDa.1 (2 bar): coletas dos dias 24/05/2018, 28/05/2018, 31/05/2018, e 04/06/2018.
- Ensaios de ultrafiltração em membrana de RC de 100 kDa.1 (2 bar): coletas dos dias 24/05/2018, 28/05/2018, 31/05/2018 e 19/06/2018.
- Ensaios de ultrafiltração em membrana de PES de 500 kDa.2 (2 bar): coletas dos dias 09/08/2018, 13/08/2018, 16/08/2018, e 20/08/2018.
- Ensaios de ultrafiltração em membrana de PES de 500 kDa.3 (1,5 bar): coletas dos dias 09/08/2018 e 13/08/2018.
- Ensaios de ultrafiltração em membrana de PES de 500 kDa.4 (1,5 bar): coletas dos dias 20/09/2018, 24/09/2018, 27/09/2018, e 01/10/2018.

- Ensaios de ultrafiltração em membrana de RC de 100 kDa.2 (1,5 bar): coletas dos dias 20/09/2018, 24/09/2018, 27/09/2018, e 01/10/2018.

2. Dados brutos de determinação de proteínas totais referentes aos valores dados na Tabela 4.3.

Tabela B.1: Concentrações amostrais de proteínas totais para frações recolhidas em ultrafiltrações ( $\Delta P = 2$  bar) em PES de 500 kDa e em RC de 100 kDa, em triplicata analítica.

Descrição	PES de 500 kDa ( $\mu\text{g/mL}$ )	RC de 100 kDa ( $\mu\text{g/mL}$ )
Alimentação	$33,896 \pm 2,213$	$36,912 \pm 12,672$
Fração retida	$53,076 \pm 10,061$	$55,396 \pm 1,474$

Ajuste linear:

$$y = (0,00431 \pm 0,00033837) \times x + (0,35691 \pm 0,0154) \quad (\text{B.1})$$

$$R^2 = 0,98173 \quad (\text{B.2})$$

$$F_{obs} = 162,20922 \quad (\text{B.3})$$

$$F_{(critico, \alpha=0,05)} = 18,513 \quad (\text{B.4})$$

$$F_{obs} > F_{(critico, \alpha=0,05)} \quad (\text{B.5})$$

3. Dados brutos de determinação de proteínas totais referentes aos valores dados na Tabela 4.6.

Tabela B.2: Concentrações amostrais de proteínas totais para frações recolhidas em ultrafiltrações em PES de 500 kDa ( $\Delta P = 2$  bar e 1,5 bar), em triplicata analítica.

Descrição	PES ( $\Delta P = 2$ bar) ( $\mu\text{g/mL}$ )	PES ( $\Delta P = 1,5$ bar) ( $\mu\text{g/mL}$ )
Alimentação	$110,400 \pm 18,358$	$62,143 \pm 4,011$
Fração retida	$305,894 \pm 16,6301$	$358,026 \pm 11,194$

Ajuste linear ( $\Delta P = 2$  bar):

$$y = (0,000545624 \pm 0,0000341485) \times x + (0,27643 \pm 0,00612) \quad (\text{B.6})$$

$$R^2 = 0,97695 \quad (\text{B.7})$$

$$F_{obs} = 255,29578 \quad (\text{B.8})$$

$$F_{(critico,\alpha=0,05)} = 6,6079 \quad (\text{B.9})$$

$$F_{obs} > F_{(critico,\alpha=0,05)} \quad (\text{B.10})$$

Ajuste linear ( $\Delta P = 1,5$  bar):

$$y = (0,000627478 \pm 0,0000235066) \times x + (0,27834 \pm 0,000702985) \quad (\text{B.11})$$

$$R^2 = 0,99164 \quad (\text{B.12})$$

$$F_{obs} = 712,55308 \quad (\text{B.13})$$

$$F_{(critico,\alpha=0,05)} = 6,6079 \quad (\text{B.14})$$

$$F_{obs} > F_{(critico,\alpha=0,05)} \quad (\text{B.15})$$

4. Dados brutos de determinação de proteínas de envelope de Zika referentes aos valores dados na Tabela 4.7.

Tabela B.3: Concentrações de proteínas de envelope de Zika para frações recolhidas em ultrafiltrações em PES de 500 kDa ( $\Delta P = 2$  bar e 1,5 bar), em triplicata analítica.

Descrição	PES ( $\Delta P = 2$ bar) ( $\mu\text{g/mL}$ )	PES ( $\Delta P = 1,5$ bar) ( $\mu\text{g/mL}$ )
Alimentação	$8,991 \pm 0,659$	$6,822 \pm 0,757$
Fração retida	$79,078 \pm 9,305$	$48,628 \pm 8,299$



Ajuste linear (Densitometria de proteínas de envelope de Zika):

$$y = (-2,56087 \pm 0,11307) \times x \quad (\text{B.16})$$

$$R^2 = 0,98842 \quad (\text{B.17})$$

$$F_{obs} = 512,94202 \quad (\text{B.18})$$

$$F_{(critico,\alpha=0,05)} = 6,6079 \quad (\text{B.19})$$

$$F_{obs} > F_{(critico,\alpha=0,05)} \quad (\text{B.20})$$

5. Dados brutos de determinação de proteínas de totais referentes aos valores dados na Tabela 4.8.

Tabela B.4: Concentrações amostrais de proteínas totais para frações recolhidas em ultra-filtrações em PES de 500 kDa e RC de 100 kDa a 1,5 bar, em triplicata analítica.

Descrição	PES 500 kDa ( $\mu\text{g/mL}$ )	RC 100 kDa ( $\mu\text{g/mL}$ )
Alimentação	$96,7222 \pm 5,3576$	$67,9515 \pm 0,9709$
Fração retida	$246,1667 \pm 17,4005$	$179,2783 \pm 6,4644$

Ajuste linear (PES 500 kDa):

$$y = (0,000627478 \pm 0,0000235066) \times x + (0,27834 \pm 0,000702985) \quad (\text{B.21})$$

$$R^2 = 0,99164 \quad (\text{B.22})$$

$$F_{obs} = 712,55308 \quad (\text{B.23})$$

$$F_{(critico,\alpha=0,05)} = 6,6079 \quad (\text{B.24})$$

$$F_{obs} > F_{(critico,\alpha=0,05)} \quad (\text{B.25})$$

Ajuste linear (RC 100 kDa):

$$y = (0,00103 \pm 0,0000158987) \times x + (0,29201 \pm 0,00109) \quad (\text{B.26})$$

$$R^2 = 0,94788 \quad (\text{B.27})$$

$$F_{obs} = 110,10942 \quad (\text{B.28})$$

$$F_{(critico,\alpha=0,05)} = 6,6079 \quad (\text{B.29})$$

$$F_{obs} > F_{(critico,\alpha=0,05)} \quad (\text{B.30})$$

6. Dados brutos de determinação de proteínas de envelope de Zika referentes aos valores dados na Tabela 4.9.

Tabela B.5: Concentrações de proteínas de envelope de Zika para frações recolhidas em ultrafiltrações em PES de 500 kDa e RC de 100 kDa a 1,5 bar, em triplicata analítica.

Descrição	PES 500 kDa ( $\mu\text{g/mL}$ )	RC 100 kDa ( $\mu\text{g/mL}$ )
Alimentação	$3,6336 \pm 2,3397$	$3,5421 \pm 1,5349$
Fração retida	$65,7097 \pm 7,1874$	$31,6609 \pm 12,6233$

Ajuste linear (Densitometria de proteínas de envelope de Zika):

$$y = (-2,56087 \pm 0,11307) \times x \quad (\text{B.31})$$

$$R^2 = 0,98842 \quad (\text{B.32})$$

$$F_{obs} = 512,94202 \quad (\text{B.33})$$

$$F_{(critico,\alpha=0,05)} = 6,6079 \quad (\text{B.34})$$

$$F_{obs} > F_{(critico,\alpha=0,05)} \quad (\text{B.35})$$