

TÍTULO: IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA PROTAMINA E OVALBUMINA EM PREPARAÇÕES PRÉ-VACINAIS CONTRA A FEBRE AMARELA.

Aluna: Débora Elias de Oliveira Rocha

RESUMO

Desde 1937, Bio-Manguinhos produz a vacina atenuada contra a febre amarela utilizando embriões de galinha livres de patógenos específicos. Recentemente, melhorias na produção desta vacina foram avaliadas em paralelo ao desenvolvimento da vacina inativada. Uma proposta apresentada pelo Programa de Vacinas Virais de Bio-Manguinhos para a melhoria desta vacina atenuada foi à inclusão de uma etapa de clarificação da suspensão viral, adicionando sulfato de protamina (0,5% p/v). Esta proteína básica promove a precipitação de material genético e conseqüentemente, provoca uma diminuição da viscosidade do meio, possibilitando a filtração esterilizante da suspensão viral. Com a introdução desta etapa, foi necessário desenvolver uma metodologia analítica para a identificação e quantificação da protamina residual presente na suspensão viral. Neste contexto, com base nas propriedades físico-químicas da protamina, três métodos foram testados, a saber, a cromatografia de troca catiônica, a cromatografia em fase reversa e a cromatografia de afinidade a heparina. Anteriormente, preparações virais concentradas tratadas e não tratadas com sulfato de protamina foram analisadas por cromatografia de troca catiônica com a coluna Hitrap® CM FF, a qual forneceu resultados consistentes e promissores, atingindo o limite de detecção (LD) de 10,19 µg/mL. No presente trabalho, foram testadas duas novas colunas de troca catiônica (SP FF e Hitrap® SPXL), uma coluna de fase reversa (C2/C18 µRPC) e, finalmente, uma coluna de afinidade a heparina. Excluindo a cromatografia em fase reversa, as outras colunas utilizadas mostraram resultados satisfatórios. Os melhores resultados obtidos foram os relacionados com a cromatografia de afinidade a heparina (LD = 7,84 µg / mL). Levando em consideração o tempo de eluição e o limite de detecção, os resultados obtidos para a coluna de afinidade a heparina foram superiores aos obtidos na coluna Hitrap® CM FF. No entanto, o número de ensaios para a coluna de afinidade foi inferior à realizada com a coluna de troca catiônica fraca, de modo que as etapas de lavagem da coluna (regeneração da coluna) não foram devidamente avaliadas. A possível ação da protamina sobre os ácidos nucleicos (ensaio fluorimétrico) e ovalbumina (SDS-PAGE e ELISA) presentes na suspensão viral também foi estudada. Observou-se que os ácidos nucleicos são consideravelmente precipitados pela ação do sulfato de protamina. Enquanto que o conteúdo da ovalbumina não é afetado pela adição da proteína básica à suspensão viral. Diferentes metodologias eletroforéticas e cromatográficas foram avaliadas quanto a capacidade de quantificar especificamente a ovalbumina presente nas preparações pré-vacinais. Todos os métodos testados foram inviabilizados em função da complexidade da matriz analisada, o que reafirma o uso do método imunoenzimático para a quantificação deste contaminante das vacinas de febre amarela.

Palavras-chave: Vacina febre amarela, Protamina e ovalbumina.