

CECÍLIA ALVES MOURÃO

# PURIFICAÇÃO DE FRAGMENTO Fab HUMANO EM NÍQUEL, COBRE, COBALTO E ZINCO QUELATADOS AO CM-Asp

CAMPINAS 2014



## UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

CECÍLIA ALVES MOURÃO

## PURIFICAÇÃO DE FRAGMENTO Fab HUMANO EM NÍQUEL, COBRE, COBALTO E ZINCO QUELATADOS AO CM-Asp

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Engenharia Química

Orientadora: Profa. Dra. Sonia Maria Alves Bueno

onic

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA CECÍLIA ALVES MOURÃO E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. SONIA MARIA ALVES BUENO

Dueng

CAMPINAS 2014

## Ficha catalográfica Universidade Estadual de Campinas Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura Rose Meire da Silva - CRB 8/5974

Mourão, Cecília Alves, 1989-

### M866p

Purificação de fragmentos Fab humano em níquel, cobre, cobalto e zinco quelatados ao CM-Asp / Cecília Alves Mourão. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Sonia Maria Alves Bueno.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Imunoglobulina G. 2. Purificação. 3. Cromatografia de afinidade. 4. Íons metálicos. 5. Proteínas - Purificação. I. Bueno, Sonia Maria Alves, 1961-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

### Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Purification of human Fab fragments with CM-Asp immobilized nickel, cooper, cobalt and zinc

Palavras-chave em inglês: Immunoglobulin G Purification Affinity chromatography Metallic ions Proteins - Purification Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos Titulação: Mestra em Engenharia Química Banca examinadora: Sonia Maria Alves Bueno [Orientador] Igor Tadeu Lazzarotto Bresolin Marisa Masumi Beppu Data de defesa: 29-05-2014 Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química Dissertação de Mestrado defendida por Cecília Alves Mourão e aprovada em 29 de Maio de 2014 pela banca examinadora constituída pelos doutores:

omá Buen

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. – Sonia Maria Alves Bueno Orientadora: FEQ/Unicamp

Prof. Dr./Igor Tadeu Lazzarotto Bresolin UNIFESP

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marisa Masumi Beppu FEQ/Unicamp

#### RESUMO

As imunoglobulinas G (IgG) e seus fragmentos Fab, F(ab)'<sub>2</sub> e Fv apresentam aplicações proeminentes nas áreas terapêuticas e de diagnósticos. Em determinadas situações em que a região Fc é dispensável e/ou deletéria, emprega-se preferencialmente fragmentos em relação à IgG não clivada. Tais aplicações requerem um elevado grau de pureza dessas biomoléculas. O elevado custo de obtenção de fragmentos pelas técnicas convencionais justifica a investigação de outras que possam proporcionar a obtenção dessas proteínas, combinando um menor custo com um elevado grau de pureza. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar e comparar a eficácia dos adsorventes agarose-CM-Asp-Ni(II), agarose-CM-Asp-Co(II), agarose-CM-Asp-Cu(II) e agarose-CM-Asp-Zn(II) na purificação dos fragmentos Fab de IgG humana policional, a partir de uma solução de IgG clivada pela enzima papaína. O efeito do sistema tamponante, do íon metálico e do cloreto de sódio foram avaliados. A seletividade das condições cromatográficas foi avaliada por eletroforese SDS-PAGE, Western Blotting e imunodifusão radial. Os resultados indicaram que nas cromatografias conduzidas com o quelato CM-Asp-Co(II) com Hepes e Tris-HCl, na ausência de sal, os fragmentos Fab foram obtidos separados do Fc nas frações de eluição. Nas cromatografias em CM-Asp-Ni(II) com Hepes e fosfato de sódio na presenca de NaCI e em CM-Asp-Cu(II) com Tris-HCl e fosfato de sódio na presença de NaCl, a biomolécula alvo foi obtida seletivamente nas frações não retidas (cromatografia negativa). Nas cromatografias em CM-Asp-Zn(II) não houve a recuperação seletiva dos fragmentos Fab. Os resultados das curvas de ruptura com os quelatos CM-Asp-Ni(II), CM-Asp-Co(II) e CM-Asp-Cu(II) revelaram a recuperação de 3,4 mg, 17,1 mg e 8,6 mg de Fab, respecticamente. Os fragmentos Fab foram obtidos com pureza superior a 90%, sendo que para o ligante CM-Asp-Cu(II), segundo o western blot, os fragmentos Fab foram separados da IgG não clivada. Os resultados obtidos nas condições cromatográficas estudadas evidenciam a potencialidade do emprego dos guelatos CM-Asp-Ni(II), CM-Asp-Co(II) e CM-Asp-Cu(II), imobilizados em agarose, para purificação de fragmentos Fab obtidos da clivagem enzimática da IgG humana policional.

Palavras chave: Fragmentos Fab, IMAC, Purificação, Imunoglobulina G

#### ABSTRACT

Immunoglobulins G (IgG) and their fragments Fab, F(ab)'2 and Fv are prominently applied as therapeutic and diagnostic tool. Fragments are preferably used rather than the uncleaved IgG, specially when the Fc portion is dispensable or prejudicial. For the mentioned applications, high purity preparations are required. The high costs associated with the conventional downstream processing of these biomolecules is the driving force to investigate purification techniques that can combine lower cost with high purification factor. Therefore, the goal of this work is to evaluate and compare the efficiency of CM-Asp-Ni(II), CM-Asp-Co(II), CM-Asp-Cu(II) and CM-Asp-Zn(II) adsorbents in the purification of Fab fragments from papain-digested human IgG. The effects of buffers, metal-ion and NaCl addition were also studied. The adsorbent/buffer selectivity towards the targeted molecule was evaluated by SDS-PAGE, Western Blotting and radial immunodiffusion assays. Chromatography with CM-Asp-Co(II) as chelated using Hepes and Tris-HCl buffers resulted in Fab recovery in the elution fractions. Whereas the chromatography with CM-Asp-Ni(II) and CM-Asp-Cu(II) both as chelated using Hepes sodium phosphate buffers with NaCl addition resulted in Fab selective recovery in nonretained fractions (negative chromatography). The adsorbent CM-Asp-Zn(II) did not show Fab selective recovery. Breakthrough curves experiments showed that CM-Asp-Ni(II), CM-Asp-Co(II) e CM-Asp-Cu(II) recovered Fab with purity higher than 90%. When chelated CM-Asp-Cu(II) was use as ligands, Fab fragments were recovery separated from intact IgG as shown in western blot. Results obtained in the chromatographic conditions studied showed the potential use of CM-Asp-Ni(II), CM-Asp-Co(II) and CM-Asp-Cu(II) immobilized in agarose for the purification of Fab fragments from cleaved human polyclonal IgG.

Keywords: Fragment Fab; IMAC; Purification; Immunoglobulin G.

		,		
CI			DI	$\mathbf{n}$
3	UIV	IA	nı	U

3.2. Métodos74
3.2.1. Ativação do gel com epicloridrina74
3.2.2. Imobilização do ácido aspártico carboximetilado no gel ativado75
3.2.3. Determinação da densidade de ligantes75
3.2.4. Obtenção dos fragmentos Fab e Fc de IgG humana policional76
3.2.5. Experimentos cromatográficos77
3.2.6. Métodos analíticos78
3.2.6.1. Dosagem de proteínas totais78
3.2.6.2. Eletroforese SDS-PAGE78
3.2.6.3. Western Blotting79
3.2.6.4. Quantificação de fragmentos Fab por imunodifusão radial80
3.2.7. Determinação das curvas de ruptura de IgG82
3.2.8. Purificação sequencial dos fragmentos Fab e Fc para determinação do pl83
3.2.8.1. Purificação em Sepharose - proteína A83
3.2.8.2. Purificação dos fragmentos Fab e Fc por cromatografia de exclusão molecular
3.2.9. Eletroforese de focalização isoelétrica (Isoelectric focusing – IEF)84
CAPÍTULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÃO85
4.1. Efeito do íon metálico níquel na purificação de fragmentos Fab85
4.1.1. Determinação do ponto de ruptura da agarose-CM-Asp-Ni(II)92
4.2. Efeito do íon metálico cobre na purificação de fragmentos Fab95
4.2.1. Determinação do ponto de ruptura do adsorvente agarose-CM-Asp-Cu(II).101
4.3. Efeito do íon metálico cobalto na purificação de fragmentos Fab104

4.3.1. Interação do CM-Asp-Co(II) com fragmento Fab	107
4.3.2. Purificação de Fab em agarose-CM-Aps-Co(II): eluição por concentração de imidazol e por diminuição do pH	aumento da 110
4.3.3. Determinação da capacidade de adsorção dinâmica do adsorve CM-Asp-Co(II)	ente agarose- 111
4.4. Efeito do íon metálico zinco na purificação de fragmentos Fab	114
CAPÍTULO 5: CONCLUSÕES	117
CAPÍTULO 6: SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	119
CAPÍTULO 7: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	120
APÊNDICE A	132
APÊNDICE B	133
APÊNDICE C	153
APÊNDICE D	173
APÊNDICE E	185

#### AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho, em especial:

A Deus, pois "toda boa dádiva e todo dom perfeito vem do alto" (Tiago 1:17).

À minha mãe Rita pela dedicação salutar, pelas orações e pelo exemplo de profissional e ética.

À minha avó Rita (*in memorian*) pela educação, pelo amor incondicional e pelos exemplos de superação e de fé.

Às amigas do Centro Cultural Altavila pelo carinho em cada acolhida, pelo cuidado, pelas orações, pelos momentos, ensinamentos e conselhos.

À professora Dra. Sonia Maria Alves Bueno pela orientação, paciência, dedicação e pelos ensinamentos. Muito obrigada pela oportunidade de trabalhar com a senhora.

Aos professores Dra. Ângela Maria Moraes e Dr. Everson Alves Miranda por disponibilizarem as instalações de seus laboratórios.

Aos professores Dra. Lucimara Gaziola de la Torre e Dr. Everson Alves Miranda pelas sugestões e correções apresentadas no exame de qualificação.

Aos professores Dra. Marisa Masumi Beppu e Dr. Igor Tadeu Lazzarotto Bresolin que gentilmente aceitaram o convite para participar da banca examinadora deste trabalho. Muito obrigada pelas sugestões, correções e pelas palavras de motivação.

As amigas: Carla, Gabriela, Gisele Pavan e Nemaila pelas sugestões, dicas, pelos ensinamentos, pela ajuda, convivência e amizade. Vocês foram essenciais para a realização deste trabalho.

Aos colegas de laboratório: Cecília Bueno, Gisele Atsuko, Fernanda, Renata, Ana Luiza, Luana, Selma, Max e Naimy.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo.

Ao CNPq, à FAPESP e à CAPES/Proex, pelo auxílio financeiro.

XV

"Onde estão as nossas aspirações, nosso trabalho, nossos amores - aí está o lugar do nosso encontro cotidiano com Cristo. A vocação cristã consiste em transformar em poesia heróica a prosa de cada dia. Na linha do horizonte, parecem unir-se o céu e a terra. Mas não: onde de verdade se juntam é no coração, quando se vive santamente a vida diária."

(São Josemaria Escrivá)

#### LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1: Estrutura das imunoglobulinas, com as regiões de domínios constantes CH1, CH2 e CH3 para a cadeia pesada e CL para a cadeia leve e com as regiões de domínio variável designado por VH e VL (a). Esquema das regiões determinantes de complementariedade (CDR) sítio dos anticorpos е de ligação ao antígeno (b). Figura 2.2: Esquema dos fragmentos Fc e Fab obtidos pela clivagem das IgG pela enzima papaína. (Fonte: Adaptado de ABBAS e LICHTMAN, 2003). ..... 46 Figura 2.3: Esquema dos fragmentos Fc`e F(ab)'2 obtidos pela clivagem das IgG com a enzima pepsina. (Fonte: Adaptado de ABBAS e LICHTMAN, 2003)...... 47 Figura 2.4: Esquema dos fragmentos scFv, scAb e dsFv formados pelas regiões de domínio variável designado por VH e VL das cadeias pesada e leve, respectivamente e pela região de Figura 2.5: Estrutura do agente quelante IDA acoplado a uma matriz S e com um íon metálico  $(M^{2+})$ hexacoordenado imobilizado. Figura 2.6: Estrutura do agente quelante CM-Asp acoplado a uma matriz S e com um íon metálico hexacoordenado (M<sup>2+</sup>) imobilizado. (Fonte: Adaptado de GABERC-POREKAR e Figura 2.7: Tipos de interações entre proteína e o metal quelatado (M) a uma matriz com um agente quelante imobilizado (S-im) e a proteína. (a) Interação eletrostática e de carga induzida, (b) ligação de coordenação, (C) ligação covalente. Figura 3.1: Esquema das principais etapas realizadas durante o ensaio de Western Blotting Figura 3.2: Esquema das principais etapas realizadas durante Figura 3.3 Esquema dos ligantes e dos tampões de equilíbrio empregados na realização das Figura 4.1: Porcentagem de proteínas totais adsorvidas e não adsorvidas das cromatografias realizadas no quelato metálico CM-Asp-Ni(II) empregando os tampões de adsorção Hepes, Tris-HCI e fosfato de sódio na ausência e presença de cloreto sódio. Quantidade de níquel

**Figura 4.5:** a) Início da curva de ruptura no gel agarose-CM-Asp-Ni(II) em tampão Hepes, com NaCl (1,0 mol/L), em pH 7,5. Leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/mim. I: Injeção de 33,0 mL de solução de digestão (Fab e Fc de IgG humana) na concentração de 0,97 mg/mL (concentração de proteína total estimada pelo método de Bradford, com BSA como proteína de referência). b) L: Lavagem tampãoHepes, com NaCl (1,0 mol/L), pH 7,5. E: Eluição tampão Hepes, com NaCl (1,0 mol/L), contendo 100,0 mmol/L de imidazol, pH 7,5. R: Regeneração com EDTA 100 mmol/L, pH 7,0.

Figura 4.20: (a) Curva de ruptura no gel agarose-CM-Asp-Co(II) utilizando sistema tamponante Hepes, em pH 7,5. Leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. I: Injeção de 86,0 mL de solução de IgG humana clivada na concentração de 2,09 mg/mL (concentração de proteína total estimada pelo método de Bradford, com BSA como proteína de referência). (b) L: Lavagem com tampão Hepes 25 mmol/L, pH 7,5. E: Eluição com tampão Hepes, contendo 100,0 mmol/L de imidazol, pH 7,5. R: Regeneração com EDTA 100 mmol/L, pH 7,0......112 Figura 4.21: Gel de eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras: M - Marcador de baixa massa molecular; IgG – Marcador de IgG; A – Fração de injeção: F<sub>7</sub> – flowthrough (fração 7); F<sub>22</sub> – flowthrough (fração 22); F<sub>44</sub> – flowthrough (fração 44); F<sub>45</sub> – flowthrough (fração 45); L<sub>51</sub> - Lavagem (fração 51); L<sub>106</sub> - Lavagem (fração 1106); E<sub>156</sub> - Eluição (fração 156); E<sub>157</sub> - Eluição Figura 4.22: Perfil do Western blot das frações cromatográficas realizadas em agarose-CM-Asp-Co(II) em sistema tamponante Hepes em pH 7,5. Lavagem com tampão Hepes pH 7,5. Eluição com tampão Hepes contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5. Regeneração com EDTA 100 mmol/L, pH 7,0. Membrana de nitrocelulose: Mc - Marcador de massa molecular préinjeção: Fcorado: Inj solucão "pool" flowthrough; de do

Figura 4.24: Perfil eletroforético das frações cromatográficas dos experimentos em agarose-CM-Asp-Zn(II) utilizando os sistemas tamponantes Hepes, Tris-HCI e fosfato de sódio pH 7,5, na ausência e presença de cloreto de sódio. M - Marcador de baixa massa molecular; IgG -Figura 4.25: Western blot das frações cromatográficas dos experimentos em agarose-CM-Asp-Zn(II) utilizando sistema tamponante (a) Tris-HCl na presença de NaCl Mc - Marcador de massa molar; IgG – Marcador de IgG; L - Lavagem E - Eluição......116 Figura A: Gel de eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras: M – Marcador de baixa Figura B-1: Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) de adsorção de fragmentos de IgG a partir de solução contendo fragmentos Fab e Fc em coluna contendo gel agarose-CM-Asp-Ni(II) utilizando sistema tamponante Hepes na ausência de NaCl em pH 7,5. Leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. I: Injeção de 1,0 mL de solução contendo fragmentos Fab e Fc de IgG humana na concentração de 3,89 mg/mL. L: Lavagem com tampão Hepes, pH 7,5. E: Eluição com tampão Hepes contendo 100,0 mmol/L de imidazol, pH 7,5. R: Regeneração com EDTA 100 mmol/L, pH 7,0. Gel de eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras: M -Marcador de baixa massa molecular; IgG – Marcador de IgG; A – Solução de injeção; L – 

Figura B-3: Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) de adsorção de fragmentos de IgG a

partir de solução contendo fragmentos Fab e Fc em coluna contendo gel agarose-CM-Asp-Ni(II) utilizando sistema tamponante Hepes, na presença de NaCl 1 mol/L, em pH 7,5. Leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. I: Injeção de 1,0 mL de solução contendo fragmentos Fab e Fc de IgG humana na concentração de 3,66 mg/mL. L: Lavagem com tampão Hepes, na presença de NaCl 1 mol/L, pH 7,5. E: Eluição com tampão Hepes, na presença de NaCl 1 mol/L, contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5. R: Regeneração com EDTA 100 mmol/L, pH 7,0. Gel de eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras: M – Marcador de baixa massa molecular: Figura B-4: Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) de adsorção de fragmentos de IgG a partir de solução contendo fragmentos Fab e Fc em coluna contendo gel agarose-CM-Asp-Ni(II) utilizando sistema tamponante Hepes, na presença de NaCl 1 mol/L, em pH 7,5. Leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. I: Injeção de 1,0 mL de solução contendo fragmentos Fab e Fc de IgG humana na concentração de 3,73 mg/mL. L: Lavagem com tampão Hepes, na presença de NaCl 1 mol/L, pH 7,5. E: Eluição com tampão Hepes, na presença de NaCl 1 mol/L, contendo 100mmol/L de imidazol, pH 7,5. R: Regeneração com EDTA 100 mmol/L, pH 7,0. Gel de eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras: M - Marcador de baixa massa molecular; IgG – Marcador de IgG; A – Solução de injeção; L – Lavagem; E – Eluição...... 137 Figura B-5: Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) de adsorção de fragmentos de IgG a partir de solução contendo fragmentos Fab e Fc em coluna contendo gel agarose-CM-Asp-Ni(II) utilizando sistema tamponante Tris-HCI, em pH 7,5. Leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. I: Injeção de 1,0 mL de solução contendo fragmentos Fab e Fc de IgG humana na concentração de 3,49 mg/mL. L: Lavagem com tampão Tris-HCl, pH 7,5. E: Eluição com tampão Tris-HCl, contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5. R: Regeneração com EDTA 100 mmol/L, pH 7,0. Gel de eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras: M - Marcador de baixa massa molecular; IgG – Marcador de IgG; A – Solução de injeção; L – Lavagem; E – Eluição. ...... 139 Figura B-6: Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) de adsorção de fragmentos de IgG a partir de solução contendo fragmentos Fab e Fc em coluna contendo gel agarose-CM-Asp-Ni(II) utilizando sistema tamponante Tris-HCI, em pH 7,5. Leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. I: Injeção de 1,0 mL de solução contendo fragmentos Fab e Fc de IgG humana na concentração de 3,45 mg/mL. L: Lavagem com tampão Tris-HCl, pH 7,5. E: Eluição com tampão Tris-HCl, contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5. R: Regeneração com EDTA 100 mmol/L, pH 7,0. Gel de eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras: M - Marcador de baixa massa molecular; IgG – Marcador de IgG; A – Solução de injeção; L – Lavagem; E – Eluição. ..... 140 Figura B-7: Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) de adsorção de fragmentos de lgG a partir de solução contendo fragmentos Fab e Fc em coluna contendo gel agarose-CM-Asp-Ni(II) utilizando sistema tamponante Tris-HCI, na presença de NaCI 1 mol/L, em pH 7,5. Leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. I: Injeção de 1,0 mL de solução contendo fragmentos Fab e Fc de IgG humana na concentração de 3,53 mg/mL. L: Lavagem com tampão Tris-HCI, na presença de NaCl 1 mol/L, pH 7,5. E: Eluição com tampão Tris-HCl, na presença de NaCl 1 mol/L, contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5. R: Regeneração com EDTA 100 mmol/L, pH 7,0. Gel de eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras: M - Marcador de baixa massa molecular; IgG – Marcador de IgG; A – Solução de injeção; L – Lavagem; E – Eluição. ..... 142 Figura B-8: Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) de adsorção de fragmentos de IgG a partir de solução contendo fragmentos Fab e Fc em coluna contendo gel agarose-CM-Asp-Ni(II) utilizando sistema tamponante Tris-HCI, na presença de NaCI 1 mol/L, em pH 7,5. Leito: 3.0 mL. Vazão: 0.5 mL/min. I: Injecão de 1.0 mL de solução contendo fragmentos Fab e Fc de IgG humana na concentração de 3,55 mg/mL. L: Lavagem com tampão Tris-HCI, na presença de NaCl 1 mol/L, pH 7,5. E: Eluição com tampão Tris-HCl, na presença de NaCl 1 mol/L, contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5. R: Regeneração com EDTA 100 mmol/L, pH 7,0. Gel de eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras: M - Marcador de baixa massa molecular; IgG – Marcador de IgG; A – Solução de injeção; L – Lavagem; E – Eluição. ...... 143 Figura B-9: Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) de adsorção de fragmentos de IgG a partir de solução contendo fragmentos Fab e Fc em coluna contendo gel agarose-CM-Asp-Ni(II) utilizando sistema tamponante fosfato de sódio, em pH 7,5. Leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. I: Injecão de 1,0 mL de solução contendo fragmentos Fab e Fc de IgG humana na concentração de 3,64 mg/mL. L: Lavagem com tampão fosfato de sódio, pH 7,5. E: Eluição com tampão fosfato de sódio, contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5. R: Regeneração com EDTA 100 mmol/L, pH 7,0. Gel de eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras: M -Marcador de baixa massa molecular; IgG - Marcador de IgG; A - Solução de injeção; L -

**Figura B-10:** Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) de adsorção de fragmentos de IgG a partir de solução contendo fragmentos Fab e Fc em coluna contendo gel agarose-CM-Asp-Ni(II) utilizando sistema tamponante fosfato de sódio, em pH 7,5. Leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. I: Injeção de 1,0 mL de solução contendo fragmentos Fab e Fc de IgG humana na concentração de 3,43 mg/mL. L: Lavagem com tampão fosfato de sódio, pH 7,5. E: Eluição com tampão fosfato de sódio, contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5. R: Regeneração com EDTA

**Figura C-1:** Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) de adsorção de fragmentos de IgG a partir de solução contendo fragmentos Fab e Fc em coluna contendo gel agarose-CM-Asp-Cu(II) utilizando sistema tamponante Hepes, na ausência de NaCI, em pH 7,5. Leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. I: Injeção de 1,0 mL de solução contendo fragmentos Fab e Fc de IgG

humana na concentração de 3,56 mg/mL. L: Lavagem com tampão Hepes, na ausência de NaCl, pH 7,5. E: Eluição com tampão Hepes, na ausência de NaCl, contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5. R: Regeneração com EDTA 100 mmol/L, pH 7,0. Gel de eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras: M – Marcador de baixa massa molecular; IgG – Marcador Figura C-2: Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) de adsorção de fragmentos de IgG a partir de solução contendo fragmentos Fab e Fc em coluna contendo gel agarose-CM-Asp-Co(II) utilizando sistema tamponante Hepes, na ausência de NaCI, em pH 7,5. Leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. I: Injeção de 1,0 mL de solução contendo fragmentos Fab e Fc de IgG humana na concentração de 3,64 mg/mL. L: Lavagem com tampão Hepes, na ausência de NaCl, pH 7,5. E: Eluição com tampão Hepes, na ausência de NaCl, contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5. R: Regeneração com EDTA 100 mmol/L, pH 7,0. Gel de eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras: M – Marcador de baixa massa molecular; IgG – Marcador Figura C-3: Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) de adsorção de fragmentos de IgG a partir de solução contendo fragmentos Fab e Fc em coluna contendo gel agarose-CM-Asp-Cu (II) utilizando sistema tamponante Hepes, na presenca de NaCl 1 mol/L, em pH 7.5. Leito: 3.0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. I: Injeção de 1,0 mL de solução contendo fragmentos Fab e Fc de IgG humana na concentração de 3,67 mg/mL. L: Lavagem com tampão Hepes, na presença de NaCl 1 mol/L, pH 7,5. E: Eluição com tampão Hepes, na presença de NaCl 1 mol/L, contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5. R: Regeneração com EDTA 100 mmol/L, pH 7,0. Gel de eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras: M – Marcador de baixa massa molecular; IgG – Marcador de IgG; A – Solução de injeção; L – Lavagem; E – Eluição...... 156 Figura C-4: Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) de adsorção de fragmentos de IgG a partir de solução contendo fragmentos Fab e Fc em coluna contendo gel agarose-CM-Asp-Cu (II) utilizando sistema tamponante Hepes, na presenca de NaCl 1 mol/L, em pH 7.5. Leito: 3.0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. I: Injeção de 1,0 mL de solução contendo fragmentos Fab e Fc de IgG humana na concentração de 3,46 mg/mL. L: Lavagem com tampão Hepes, na presença de NaCl 1 mol/L, pH 7,5. E: Eluição com tampão Hepes, na presença de NaCl 1 mol/L, contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5. R: Regeneração com EDTA 100 mmol/L, pH 7,0. Gel de eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras: M – Marcador de baixa massa molecular; IgG – Marcador de IgG; A – Solução de injeção; L – Lavagem; E – Eluição...... 157 Figura C-5: Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) de adsorção de fragmentos de IgG a

partir de solução contendo fragmentos Fab e Fc em coluna contendo gel agarose-CM-Asp-Cu (II) utilizando sistema tamponante Tris-HCI, em pH 7,5. Leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. I: Injeção de 1,0 mL de solução contendo fragmentos Fab e Fc de IgG humana na concentração de 3,37 mg/mL. L: Lavagem com tampão Tris-HCl, pH 7,5. E: Eluição com tampão Tris-HCl, contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5. R: Regeneração com EDTA 100 mmol/L, pH 7,0. Gel de eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras: M - Marcador de baixa massa molecular; IgG – Marcador de IgG; A – Solução de injeção; L – Lavagem; E – Eluição, ...... 159 Figura C-6: Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) de adsorção de fragmentos de IgG a partir de solução contendo fragmentos Fab e Fc em coluna contendo gel agarose-CM-Asp-Cu (II) utilizando sistema tamponante Tris-HCl, em pH 7,5. Leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. I: Injeção de 1,0 mL de solução contendo fragmentos Fab e Fc de IgG humana na concentração de 3,37 mg/mL. L: Lavagem com tampão Tris-HCl, pH 7,5. E: Eluição com tampão Tris-HCl, contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5. R: Regeneração com EDTA 100 mmol/L, pH 7,0. Gel de eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras: M - Marcador de baixa massa molecular; IgG – Marcador de IgG; A – Solução de injeção; L – Lavagem; E – Eluição. ...... 160 Figura C-7: Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) de adsorção de fragmentos de IgG a partir de solução contendo fragmentos Fab e Fc em coluna contendo gel agarose-CM-Asp-Cu (II) utilizando sistema tamponante Tris-HCI, na presença de NaCI (1 mol/L), em pH 7,5. Leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. I: Injeção de 1,0 mL de solução contendo fragmentos Fab e Fc de IgG humana na concentração de 3,49 mg/mL. L: Lavagem com tampão Tris-HCI, na presença de NaCl (1 mol/L), pH 7,5. E: Eluição com tampão Tris-HCl, na presença de NaCl (1 mol/L), contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5. R: Regeneração com EDTA 100 mmol/L, pH 7,0. Gel de eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras: M - Marcador de baixa massa molecular; IgG – Marcador de IgG; A – Solução de injeção; L – Lavagem; E – Eluição. ...... 162 Figura C-8: Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) de adsorção de fragmentos de IgG a partir de solução contendo fragmentos Fab e Fc em coluna contendo gel agarose-CM-Asp-Cu (II) utilizando sistema tamponante Tris-HCI, na presença de NaCI (1 mol/L), em pH 7,5. Leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. I: Injeção de 1,0 mL de solução contendo fragmentos Fab e Fc de IgG humana na concentração de 3,49 mg/mL. L: Lavagem com tampão Tris-HCI, na presença de NaCl (1 mol/L), pH 7,5. E: Eluição com tampão Tris-HCl, na presença de NaCl (1 mol/L), contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5. R: Regeneração com EDTA 100 mmol/L, pH 7,0. Gel de eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras: M - Marcador de baixa massa molecular; IgG – Marcador de IgG; A – Solução de injeção; L – Lavagem; E – Eluição ...... 163

Figura D-1: Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) de adsorção de fragmentos de IgG a partir de solução contendo fragmentos Fab e Fc em coluna contendo gel agarose-CM-Asp-Co(II) utilizando sistema tamponante Hepes, na ausência de NaCl, em pH 7,5. Leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. I: Injeção de 1,0 mL de solução contendo fragmentos Fab e Fc de IgG humana na concentração de 3,30 mg/mL. L: Lavagem com tampão Hepes, na ausência de NaCl, pH 7,5. E: Eluição com tampão Hepes, na ausência de NaCl, contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5. R: Regeneração com EDTA 100 mmol/L, pH 7,0. Gel de eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras: M – Marcador de baixa massa molecular; IgG – Marcador Figura D-2: Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) de adsorção de fragmentos de IgG a partir de solução contendo fragmentos Fab e Fc em coluna contendo gel agarose-CM-Asp-Co(II) utilizando sistema tamponante Hepes, na ausência de NaCl, em pH 7,5. Leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. I: Injeção de 1,0 mL de solução contendo fragmentos Fab e Fc de IgG humana na concentração de 3,55 mg/mL. L: Lavagem com tampão Hepes, na ausência de NaCl, pH 7,5. E: Eluição com tampão Hepes, na ausência de NaCl, contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5. R: Regeneração com EDTA 100 mmol/L, pH 7,0. Gel de eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras: M - Marcador de baixa massa molecular; IgG - Marcador Figura D-3: Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) de adsorção de fragmentos de IgG a partir de solução contendo fragmentos Fab e Fc em coluna contendo gel agarose-CM-Asp-Co(II) utilizando sistema tamponante Tris-HCl, na ausência de NaCl, em pH 7,5. Leito: 3,0 mL. Vazão: 0.5 mL/L. I: Injeção de 1.0 mL de solução contendo fragmentos Fab e Fc de IgG humana

 NaCI, pH 7,5. E: Eluição com tampão Hepes, na ausência de NaCI, contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5. R: Regeneração com EDTA 100 mmol/L, pH 7,0. Gel de eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras: M – Marcador de baixa massa molecular; IgG – Marcador Figura E-3: Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) de adsorção de fragmentos de IgG a partir de solução contendo fragmentos Fab e Fc em coluna contendo gel agarose-epicloridrina-CM-Asp-Zn(II) utilizando sistema tamponante Hepes, na ausência de NaCI, em pH 7.5. Leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. I: Injeção de 1,0 mL de solução contendo fragmentos Fab e Fc de IgG humana na concentração de 3,45 mg/mL. L: Lavagem com tampão Hepes, na ausência de NaCI, pH 7,5. E: Eluição com tampão Hepes, na ausência de NaCI, contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5. R: Regeneração com EDTA 100 mmol/L, pH 7,0. Gel de eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras: M – Marcador de baixa massa molecular; IgG – Marcador Figura E-4: Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) de adsorção de fragmentos de IgG a partir de solução contendo fragmentos Fab e Fc em coluna contendo gel agarose-epicloridrina-CM-Asp-Zn(II) utilizando sistema tamponante Hepes, na ausência de NaCl, em pH 7,5. Leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. I: Injeção de 1,0 mL de solução contendo fragmentos Fab e Fc de IgG humana na concentração de 3,44 mg/mL. L: Lavagem com tampão Hepes, na ausência de NaCl, pH 7,5. E: Eluição com tampão Hepes, na ausência de NaCl, contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5. R: Regeneração com EDTA 100 mmol/L, pH 7,0. Gel de eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras: M - Marcador de baixa massa molecular; IgG - Marcador 

## LISTA DE TABELAS

Tabela 2.2: Fragmentos Fab aprovados pelo FDA para uso terapêutico (Fonte: Adaptado de
HANSEL <i>et al.,</i> 2010)
Tabela 2.3: Classificação dos íons metálicos e seus principais ligantes. (Fonte: Adaptado de
MRABET e VIJAYALAKSHMI, 2002)65
Tabela2.4:Reconhecimentodosresíduosdehisitdinasdeproteínas
pelos quelatos IDA-Me <sup>2+</sup>
Tabela 3.1: Condições experimentais empregadas nas cromatografias realizadas com os
quelatos metálicos CM-Asp-Ni(II), CM-Asp-Co(II), CM-Asp-Cu(II) e CM-Asp-Zn(II)
Tabela 4.1: Balanço de massa da cromatografia em agarose-CM-Asp-Ni(II) em tampão de
equilíbrio e lavagem Hepes e fosfato de sódio, na presença de NaCl, pH 7,5; eluição: Hepes, na
presença de NaCl contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5 e regeneração: EDTA 100 mmol/L,
pH 7,0
Tabela 4.2 : Força iônica dos tampões Hepes, Tris-HCI e fosfato de sódio (25 mmol/L),
pH 7,5
Tabela 4.3: Balanço de massa da curva de ruptura em agarose-CM-Asp-Ni(II) em tampão de
equilíbrio e lavagem Hepes, NaCl (1,0 mol/L), pH 7,5; eluição: Hepes, na presença de NaCl (1,0
mol/L) contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5 e regeneração: EDTA 100 mmol/L, pH 7,0 95
Tabela 4.4. Balanço de massa da cromatografia em agarose-CM-Asp-Cu(II) com tampão de
equilíbrio e lavagem Tris-HCI e fosfato de sódio na presença de NaCI; eluição: Tris-HCI 25 na
presença de NaCl contendo 100,0 mmol/L de imidazol, pH 7,5
Tabela 4.5: Balanço de massa por RID da curva de ruptura em agarose-CM-Asp-Cu(II) em
tampão de equilíbrio e lavagem fosfato de sódio, NaCl (1,0 mol/L), pH 7,5; eluição: fosfato de
sódio, na presença de NaCl (1,0 mol/L) contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5 e
regeneração: EDTA 100 mmol/L, pH 7,0 102
Tabela 4.6: Balanço de massa da cromatografia em agarose-CM-Asp-Co(II) utilizando tampão
de equilíbrio e lavagem Hepes 25 mmol/L, pH 7,5; eluição: Hepes 25 mmol/L, contendo 100,0
mmol/L de imidazol, pH 7,5 e regeneração: EDTA 100 mmol/L, pH 7,0 107
Tabela 4.7: Balanço de massa por imunodifusão radial (RID) das frações de injeção e eluição
da curva de ruptura em agarose-CM-Asp-Co(II) em tampão de equilíbrio e lavagem Hepes pH
7,5; eluição: Hepes contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5 e regeneração: EDTA 100
mmol/L, pH 7,0

Tabela C-3: Balanço de massa da cromatografia em gel de agarose-CM-Asp-Cu(II) utilizando

tampão de equilíbrio e lavagem Tris-HCl, pH 7,5; eluição: Tris-HCl contendo 100 mmol/L de Tabela C-4: Balanco de massa da cromatografia em gel de agarose-CM-Asp-Cu(II) utilizando tampão de equilíbrio e lavagem Tris-HCI, na presença de NaCI (1 mol/L), pH 7,5; eluição: Tris-HCl, na presença de NaCl (1 mol/L), contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5 e regeneração: Tabela C-5: Balanco de massa da cromatografia em gel de agarose-CM-Asp-Cu(II) utilizando tampão de equilíbrio e lavagem fosfato de sódio, pH 7,5; eluição: fosfato de sódio contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5 e regeneração: EDTA 100 mmol/L, pH 7,0. ...... 167 Tabela C-6: Balanço de massa da cromatografia em gel de agarose-CM-Asp-Cu(II) utilizando tampão de equilíbrio e lavagem fosfato de sódio, na presença de NaCl (1 mol/L), pH 7,5; eluição: fosfato de sódio, na presença de NaCl (1 mol/L), contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5 e regeneração: EDTA 100 mmol/L, pH 7,0..... 170 Tabela C-7: Balanço de massa da curva de ruptura em gel de agarose-CM-Asp-Cu(II) utilizando tampão de equilíbrio e lavagem fosfato de sódio, na presença de NaCl 1 mol/L, pH 7,5; eluição: fosfato de sódio, na presença de NaCl 1 mol/L, contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5 e regeneração: EDTA 100 mmol/L, pH 7,0...... 172 Tabela D-1: Balanço de massa da cromatografia em gel de agarose-CM-Asp-Co(II) utilizando tampão de equilíbrio e lavagem Hepes 25 mmol/L, pH 7,5; eluição: Hepes contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5 e regeneração: EDTA 100 mmol/L, pH 7,0...... 175 Tabela D-2: Balanço de massa da cromatografia em gel de agarose-CM-Asp-Co(II) utilizando tampão de equilíbrio e lavagem Hepes, na presença de NaCl 1 mol/L, pH 7,5; eluição: Hepes, na presença de NaCl 1 mol/L, contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5 e regeneração: EDTA Tabela D-3: Balanço de massa da cromatografia em gel de agarose-CM-Asp-Co(II) utilizando tampão de equilíbrio e lavagem Tris-HCl, pH 7,5; eluição: Tris-HCl, contendo 100,0 mmol/L de imidazol, pH 7,5 e regeneração: EDTA 100 mmol/L, pH 7,0...... 179 Tabela D-4: Balanço de massa da cromatografia em gel de agarose-CM-Asp-Co(II) utilizando tampão de equilíbrio e lavagem Tris-HCI, na presença de NaCI (1M), pH 7,5; eluição: Tris-HCI, na presença de NaCl 1 mol/L, contendo 100,0 mmol/L de imidazol, pH 7,5 e regeneração: Tabela D-5: Balanço de massa da cromatografia em gel de agarose-CM-Asp-Co(II) utilizando

XXXV

tampão de equilíbrio e lavagem Fosfato de sódio, pH 7,5; eluição fosfato de sódio, contendo

Tabela D-6: Balanço de massa da cromatografia em gel de agarose-CM-Asp-Co(II) utilizando tampão de equilíbrio e lavagem fosfato de sódio, na presenca de NaCl (1M), pH 7,5; eluicão: fosfato de sódio, na presença de NaCl 1 mol/L, contendo 100,0 mmol/L de imidazol, pH 7,5 e Tabela D-7: Balanco de massa da curva de ruptura em gel de agarose-CM-Asp-Co(II) utilizando tampão de equilíbrio e lavagem Hepes, pH 7,5; eluição: Hepes, contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5 e regeneração: EDTA 100 mmol/L, pH 7,0...... 184 Tabela E-1: Balanço de massa da cromatografia em gel de agarose-CM-Asp-Zn(II) utilizando tampão de equilíbrio e lavagem Hepes, pH 7,5; eluição: Hepes, contendo 100 mmol/L de Tabela E-2: Balanco de massa da cromatografia em gel de agarose-CM-Asp-Zn(II) utilizando tampão de equilíbrio e lavagem Hepes, na presença de NaCl (1mol/L), pH 7,5; eluição: Hepes, na presença de NaCl (1mol/L), contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5 e regeneração: EDTA Tabela E-3: Balanço de massa da cromatografia em gel de agarose-CM-Asp-Zn(II) utilizando tampão de equilíbrio e lavagem Tris-HCl, pH 7,5; eluição: Tris-HCl, contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5 e regeneração: EDTA 100 mmol/L, pH 7,0...... 191 Tabela E-4: Balanco de massa da cromatografia em gel de agarose-CM-Asp-Zn(II) utilizando tampão de equilíbrio e lavagem Tris-HCI, na presença de NaCI (1 mol/L), pH 7,5; eluição: Tris-HCl na presenca de NaCl (1 mol/L), contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5 e regeneração: Tabela E-5: Balanco de massa da cromatografia em gel de agarose-CM-Asp-Zn(II) utilizando tampão de equilíbrio e lavagem Fosfato de sódio, pH 7,5; eluição: Tris-HCI, contendo 100 Tabela E-6: Balanco de massa da cromatografia em gel de agarose-CM-Asp-Zn(II) utilizando tampão de equilíbrio e lavagem fosfato de sódio, na presença de NaCl (1 mol/L), pH 7,5; eluição: fosfato de sódio, na presença de NaCI (1 mol/L), contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5 e regeneração: EDTA 100 mmol/L, pH 7,0...... 194
# LISTA DE SIGLAS

CDR	região determinante de complementariedade
CM-Asp	ácido aspártico carboximetilado
CNBr	brometo de cianogênio
EDTA	ácido etilenodiamino tetraácido
HEPES	ácido 2-[N-hidroxietil] piperazina-N'-[3-etanolsulfônico]
IDA	ácido iminodiacético
IEF	eletroforese de focalização isoelétrica
lgA	imunoglobulina A
lgD	imunoglobulina D
lgE	imunoglobulina E
lgG	imunoglobulina G
lgM	imunoglobulina M
IMAC	cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados
MÊS	ácido 2-[N-morfolino] etanosulfônico
MOPS	ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico
NTA	ácido dinitrotriacético
PEG	poli(etileno)glicol
RID	imunodifusão radial
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDS-Page	eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio
TED	tris(carboximetil)etilenodiamina
TEMED	N, N, N', N'- tetra-metilenodiamina
TREN	tris-2(aminoetil)amina
Tris	Tris(hidroximetil)-aminometano

xxxviii

## CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

As imunoglobulinas G (IgG) são relevantes anticorpos presentes no plasma animal que apresentam a finalidade de reconhecer e se ligar a antígenos específicos, impedindo a ligação desses aos receptores de células hospedeiras. As IgGs são moléculas muito utilizadas em testes diagnósticos (LENHARDT *et al.,* 2004), em terapias, tais como tratamento de câncer, infecções, e doenças degenerativas (ELBAKRI *et al.,* 2010) e como ligantes de afinidade em processos de purificação de proteínas (MARASCO e SUI, 2007).

As IgGs, quando clivada pelas enzimas proteolíticas papaína e pepsina, são reduzidas em fragmentos. Ao ser clivada pela enzima papaína libera um fragmento Fc e dois fragmentos Fab, os quais possuem massa molar de aproximadamente 50 kDa e 55 kDa, respectivamente. Ao ser clivada pela enzima pepsina libera um fragmento F(ab'2) e dois fragmentos Fc`, os quais possuem massa molar de aproximadamente 110 kDa e 25 kDa, respectivamente (LENHINGHER *et al.*, 2002; ABBAS e LICHTMAN, 2003). Por possuírem massa molar e tempo de meia-vida inferiores ao da IgG intacta, seus fragmentos apresentam um menor tempo de depuração plasmática e a transferência de massa desses nos tecidos alvo ocorre com mais facilidade (CHAMES, *et al.*, 2009). Em determinadas finalidades, tais como nos tratamentos de isquemia cardíaca, doença degenerativa dos olhos e envenenamento pela picada de serpentes, nos diagnósticos por imagem *in vivo* e nos tratamentos de alguns cânceres (HOLLIGER e HUDSON, 2005), nas quais a porção Fc é dispensável, a utilização dos fragmentos F(ab'2) e Fab é preferível em relação à IgG não clivada.

Um dos requisitos para o emprego da IgG e de seus fragmentos em diagnósticos *in vitro*, terapias e imagens *in vivo* é que essas biomoléculas apresentem um elevado grau de pureza. Estima-se que a aplicação dos fragmentos de anticorpos nesses segmentos representa, aproximadamente, 6 bilhões de dólares por ano (HOLLIGER e HUDSON, 2005). Os custos para a purificação de bioprodutos são um fator relevante na produção, uma vez que correspondem a 45 a 92% do custo total (STRAATHOF, 2011). Portanto, é necessário o desenvolvimento de estudos visando o emprego de técnicas de baixo custo e a redução do número de operações envolvidas nos processos de purificação e recuperação de biomoléculas.

A purificação de IgG e de seus fragmentos é, normalmente, realizada por meio da técnica de cromatografia de afinidade, empregando como ligantes a proteína A ou proteína G (HUSE *et al.*, 2002). No entanto, há alguns problemas decorrentes da utilização desses ligantes, tais como sua inativação após sucessivos ciclos de purificação e a necessidade de condições drásticas de eluição devido a alta afinidade desses ligantes pelas imunoglobulinas, podendo, como consequência, desnaturar o anticorpo, inativando-o e desprender o ligante da matriz (ROQUE *et al.*, 2005; ROQUE *et al.*, 2007; DENIZLI, 2011; AYYAR *et al.*, 2012). Além disso, ligantes bioespecíficos apresentam custo elevado. Diante desses ligantes, que possam proporcionar a obtenção desses biocompostos combinando baixo custo com um elevado grau de pureza. Uma das alternativas à esses ligantes são os pseudobioespecíficos, tais como os tiofílicos (LUTOMSKI *et al.*, 1995; GUERRIER *et al.*, 2001), aminoácidos (BUENO *et al.*, 2002; TODOROVA-BALVAY *et al.*, 2004; RIBEIRO *et al.*, 2008).

Os íons metálicos imobilizados são empregados na técnica denominada de cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC), a qual tem como princípio a afinidade entre os íons metálicos imobilizados em uma matriz sólida por determinados resíduos de aminoácidos acessíveis na superfície de uma biomolécula em solução (PORATH, 1988). Em relação à cromatografia de afinidade empregando as proteínas A e G como ligantes, essa técnica apresenta as vantagens de apresentar um menor custo, de possibilitar várias regenerações da coluna sem que suas propriedades sejam alteradas e de permitir a eluição da biomolécula adsorvida em condições mais brandas (PORATH, 1992; RIBEIRO, *et al.*, 2008; YAVUZ *et al.*, 2012).

Embora a técnica de IMAC apresente tais vantagens, há algumas limitações na sua utilização. Entre elas, a possibilidade do desprendimento dos íons metálicos

quelatados, acarretando contaminação da proteína de interesse а e, consequentemente, comprometendo a utilização terapêutica dessas, uma vez que esses metais são tóxicos e muitos são cancerígenos (CHEUNG et al., 2012). No entanto, esse inconveniente pode ser contornado por meio da eliminação dos íons metálicos empregando a diafiltração ou injetando a solução contendo a proteína alvo em uma coluna cromatográfica contendo um agente pentadentado imobilizado, como o TED (tris(carboximetil)etilenodiamina), o qual captura os íons metálicos desprendidos. Outra desvantagem da técnica de IMAC é a possível captura do íon metálico pela proteína de interesse, influenciando negativamente а função biológica e impossibilitando a sua aplicação terapêutica (PORATH, 1992; GUTIÉRREZ et al., 2007; BRESOLIN et al., 2009).

Nessa técnica, um agente quelante, tal como ácido iminodiacético (IDA), é imobilizado por meio de ligações covalentes em uma matriz sólida. Posteriormente, um íon metálico é quelatado a esse agente por meio de ligações de coordenação. A biomolécula alvo é, então, adsorvida pela formação de ligações de coordenação entre os íons metálicos imobilizados e determinados resíduos de aminoácidos acessíveis na superfície da biomolécula, por exemplo, o anel imidazol (PORATH, 1992).

Em 1994, Hale e Beidler propuseram que uma região rica em histidina na região de domínio constante CH3 da cadeia pesada de IgG<sub>1</sub> monoclonal seria responsável pela adsorção de IgG ao quelato metálico IDA-Ni(II). Mais tarde, Vançan e colaboradores (2002) demostraram a potencialiade dos íons metálicos Co(II), Cu(II), Ni(II), Zn(II), quelatados ao IDA, para a purificação de IgG a partir do plasma humano. A fim de elucidar a interação entre íons metálicos quelatados ao IDA e anticorpos, Todorova-Balvay e colaboradores (2004), por meio de cálculos computacionais, revelaram a presença de um *cluster* de histidina no fragmento Fc das IgG, o qual foi relacionado a afinidade dos fragmentos Fc' pelos quelatos IDA-Zn(II) e IDA-Co(II).

Estudos explorando a técnica IMAC têm revelado que a purificação de IgG é influenciada pelo tipo de agente quelante (RIBEIRO, *et al.*, 2008; BRESOLIN, *et al.*, 2010; MING 2011), tipo de íon metálico imobilizado (SERPA *et al.*, 2005; RIBEIRO, *et al.*, 2008; BRESOLIN, *et al.*, 2010) e pelas características da fase móvel como, tampão

de adsorção (VANÇAN *et al.*, 2002), pH (LIOU *et al.*, 2008) e força iônica (PAVAN, 2011; MING, 2011).

O quelato metálico, ou seja, o agente quelante e o íon metálico,tem um grande efeito na capacidade e na seletividade do íon metálico em adsorver proteínas em processos de purificação de biomoléculas por IMAC. Quanto mais polidentado for o agente quelante, mais estáveis são os quelatos formados entre o agente quelante e os íons metálicos, porém, mais fraca a interação do metal com a proteína (número menor de sítios livres para interação) (GABERC-POREKAR e MENART, 2001; TODOROVA e VIJAYALAKSHMI, 2006; PRASANA e VIJAYALAKSHMI, 2010;).

Estudos recentes têm demonstrado que o agente quelante tetradentado ácido aspártico carboximetilado (CM-Asp) quelatado a íons metálicos de transição, proporcionou maior grau de pureza quando comparado com o tridentado IDA e com o pentadentado TED, na purificação de proteínas naturais que apresentam resíduos de histidina acessíveis em sua superfície e proteínas recombinantes com cauda de histidina (BRESOLIN *et al.*, 2009; de GÓES *et al.*, 2010). O estudo comparativo entre os agentes quelantes IDA e CM-Asp, revelou a potencialidade do quelato CM-Asp-Co(II) para purificação de IgG a partir do soro humano (MING, 2011). Nesse trabalho, o autor relatou a recuperação dessa proteína com alta pureza.

Recentemente, da Silva e colaboradores (2014) investigaram a utilização do metal Ni(II) quelatado ao agente quelante tris-2(aminoetil)amina (TREN) para a purificação de fragmentos Fab de IgG adicionados artificialmente em extrato de soja. Os fragmentos foram recuperados com uma pureza superior a 90%.

Os estudos citados anteriormente sugerem a potencialidade de IMAC para os processos de recuperação e purificação de anticorpos e seus fragmentos. Baseando-se nesses estudos, pressupõem-se que uma contribuição para processos de purificação de fragmentos Fab seria combinar a seletividade proporcionada pelo agente quelante CM-Asp, com a afinidade que os metais de transição Co(II), Cu(II), Ni(II), Zn(II) apresentam por resíduos de histidina acessíveis. Uma vez que os fragmentos Fc das lgGs apresentam um *cluster* de histidina, é possível que essas biomoléculas sejam adsorvidas ao quelato metálico, permitindo a recuperação dos fragmentos Fab nas

frações não retidas da cromatografia. As características do tampão de adsorção, por influenciar as interações entre proteínas e ligantes, poderiam ser manipuladas a fim de se recuperar os fragmentos Fab com um elevado grau de pureza.

## 1.2. Objetivo

Este trabalho teve como objetivo o estudo da purificação de fragmentos Fab obtidos por meio da clivagem enzimática da IgG humana policional em agarose contendo o agente quelante CM-Asp imobilizado, avaliando os efeitos do íon metálico (Cu(II), Ni(II), Co(II) e Zn(II)), do sistema tamponante (Hepes, Tris-HCI e fosfato de sódio) e do cloreto de sódio.

Para atingir esse objetivo, foram propostas as seguintes etapas:

a- Ativação do gel agarose com epicloridrina e imobilização do agente quelante CM-Asp;

b- Cromatografias em géis de agarose contendo os quelatos CM-Asp-Ni(II), CM-Asp-Co(II), CM-Asp-Cu(II) e CM-Asp-Zn(II) imobilizados, empregando os sistemas tamponantes Hepes, Tris-HCI e fosfato de sódio na ausência e presença de cloreto de sódio;

c- Avaliação da purificação de fragmentos Fab por meio do rendimento, fator de purificação e grau de pureza;

d- Determinação de curvas de ruptura (*breakthrough*) empregando as condições cromatográficas que proporcionaram os melhores resultados de purificação de fragmentos Fab, com a finalidade de determinar o ponto de ruptura e a capacidade dinâmica do adsorvente.

43

## CAPÍTULO 2: REVISÃO DE LITERATURA

#### 2.1. As imunoglobulinas e seus fragmentos

As imunoglobulinas são anticorpos presentes no plasma animal, produzidas por células do sistema adaptativo imune, denominadas de linfócitos B. Essas células, na presença de antígenos, secretam as imunoglobulinas as quais possuem a função de permear o plasma reconhecendo e se ligando a um antígeno específico e, consequentemente, dificultando a ligação desses antígenos aos receptores de células hospedeiras (ALBERTS *et al.*, 2008).

Os anticorpos podem ser classificados em monoclonais ou policionais de acordo com a origem. Os anticorpos derivados de diferentes clones de linfócitos B são denominados de policionais e apresentam diferentes sítios de ligações ao antígeno e especificidade. Por outro lado, os monoclonais são derivados de um único clone de linfócito B, apresentando, portanto, um único sítio de ligação ao antígeno e uma especificidade definida (TAMASHIRO e AUGUSTO, 2008).

A estrutura química das imunoglobulinas foi elucidada primeiramente pelos pesquisadores Rodney Porter e Gerald Edelman nas décadas de 50 e 60, respectivamente. Essas são glicoproteínas que apresentam em suas estruturas de 82 a 96% de aminoácidos e 4 a 18% de carboidratos. As imunoglobulinas são constituídas por quatro cadeias polipeptídicas, as quais são interligadas por ligações dissulfeto (Figura 2.1). Duas dessas cadeias são denominadas de cadeia pesada e apresentam massa molar de 50 a 70 kDa. As outras duas são conhecidas por cadeia leve e possuem de massa molar de 25 kDa (ALBERTS *et al.,* 2008).

As cadeias pesadas e leves apresentam um domínio variável designado por VH e VL, respectivamente. Cada domínio variável compreende uma sequência variável de

aminoácidos denominada de região determinante de complementariedade (CDR) (AYYAR *et al.*, 2012).



**Figura 2.1**: Estrutura das imunoglobulinas, com as regiões de domínios constantes CH1, CH2 e CH3 para a cadeia pesada e CL para a cadeia leve e com as regiões de domínio variável designado por VH e VL (a). Esquema das regiões determinantes de complementariedade (CDR) dos anticorpos e sítio de ligação ao antígeno (b). (Fonte: Adaptado de ALBERTS *et al.*, 2008).

Nas cadeias leves e pesadas, também se encontram as regiões de domínios constantes, designadas por CH1, CH2 e CH3 para a cadeia pesada e CL para a cadeia leve (ALBERTS *et al.*, 2008). As IgG estruturalmente possuem configuração na forma de Y e dois sítios de ligações ao antígeno, os epítopos, o que confere a habilidade de se ligarem simultaneamente a dois antígenos. Além disso, apresentam uma região flexível entre os domínios CH1 e CH2 (ABBAS e LICHTMAN, 2003).

Nos mamíferos, há cinco classes de imunoglobulinas, as quais são classificadas em imunoglobulina A (IgA), imunoglobulina D (IgD), imunoglobulina E (IgE), imunoglobulina G (IgG) e imunoglobulina M (IgM). Essas se diferenciam quanto à composição de aminoácidos nas regiões variáveis, quanto à massa molar, forma molecular e ponto isoelétrico (MEULENBROEK, 2008; ALBERTS *et al.*, 2008).

As imunoglobulinas G constituem a classe de anticorpos presentes em maior proporção no plasma sanguíneo, representando aproximadamente 75% das imunoglobulinas totais. Essas são subdividas em quatro subclasses IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> e IgG<sub>4</sub> (MEULENBROEK, 2008). As IgG podem ser reduzidas em suas regiões

constituintes quando submetidas a ação das enzimas proteolíticas papaína, pepsina, tripsina, elastase, bromelina e ficina (GODING, 1983). No entanto, normalmente se emprega a papaína e a pepsina para se obter os fragmentos de IgG. A clivagem das IgG por meio da enzima papaína (Figura 2.2) origina três fragmentos de massas molares similares (ABBAS e LICHTMAN, 2003).



**Figura 2.2:** Esquema dos fragmentos Fc e Fab obtidos pela clivagem das IgG pela enzima papaína. (Fonte: Adaptado de ABBAS e LICHTMAN, 2003).

Dois desses fragmentos são idênticos e denominados de Fab (ab, *antigenbinding*). Os fragmentos Fab contêm o sítio de ligação ao antígeno, apresentam toda a cadeia leve e os domínios VH e CH1 das cadeias pesadas. O terceiro fragmento originado da clivagem das IgG, pela papaína, é denominado de Fc (c, *crystallizable*) e apresenta a região carboxiterminal das cadeias pesadas (PARSLOW, 1997). A porção Fc das IgG participa das funções biológicas de fagocitose de antígenos ligados a anticorpos, da ativação de mastócitos e do direcionamento e ativação de alguns linfócitos derivados da medula óssea. Essas funções são decorrentes da capacidade da região Fc se ligar a complexos protéicos presentes na superfície de macrófagos, monócitos, eosinófilos e outras células (ABBAS e LICHTMAN, 2003).

As IgG também podem ser clivadas pela enzima pepsina (Figura 2.3) originando um fragmento F(ab)'<sub>2</sub> e dois fragmentos Fc` (LENHINGHER *et al.*, 2002).



**Figura 2.3:** Esquema dos fragmentos Fc`e F(ab)'2 obtidos pela clivagem das IgG com a enzima pepsina. (Fonte: Adaptado de ABBAS e LICHTMAN, 2003).

Além dos fragmentos obtidos por meio da clivagem proteolíticas das imunoglobulinas, existem os construídos por meio da tecnologia do DNA recombinante. Alguns exemplos desses fragmentos (Figura 2.4) são os scFv (*single-chain antibody variable fragments*), formados por um domínio variável da cadeia pesada e um da leve interligados por um peptídeo, os scAb (*single-chain antibody fragment*) formados por um domínio variável da cadeia pesada e um da leve e uma cadeia leve constante e os dsFv (*disulfide-stabilized antibody variable fragments*) formados por um domínio variável da cadeia pesada e um da leve, unidos por ligação dissulfeto (WEISSER e HAL, 2009; AYYAR *et al.,* 2012).





Os fragmentos Fab são obtidos por meio da clivagem das IgG com a enzima papaína (TERNYNCK e AVRAMEAS, 1987) ou por meio da tecnologia do DNA recombinante, utilizando diversos sistemas de expressão tais como, células de inseto (KURASAWA *et al.*, 2013), bactérias (XIANG *et al.*, 2002; MIETHE *et al.*, 2013), células animais (ZHAO *et al.*, 2009b) e plantas (WINICHAYAKUL *et al.*, 2012). Os fragmentos Fab são caracterizados por apresentarem pontos isoelétricos de 7,0 a 9,5 e tempo de meia-vida de 0,3 a 0,8 dias. Os fragmentos Fab são constituídos pelas cadeias leves, as quais apresentam massa molar de aproximadamente 23 kDa. Tais cadeias podem ser classificadas em dois tipos: tipo kappa ( $\kappa$ ), as quais representam cerca de 70% das imunoglobulinas humanas, ou lambda ( $\lambda$ ) (ABBAS e LICHTMAN, 2003).

Em aplicações peculiares, nas quais a porção Fc é dispensável ou não desejável, a utilização dos fragmentos Fab é preferível em relação às IgG intacta. Essas aplicações compreendem diagnósticos com exibição de imagens *in vivo*, detecção de determinadas moléculas em tempo real (ERTURK *et al.*, 2011), terapia gênica, tratamentos de cânceres (NISHIKAWA *et al.*, 2012). Nesses casos, a presença da porção Fc resultaria na interação com receptores na superfície de diversos tipos de células, acarretando um alto tempo de meia vida, o que afeta negativamente as imagens de diagnósticos. Além disso, a interação da porção Fc com determinados receptores na superfície de células normais pode desencadear efeitos colaterais, por exemplo, a liberação intensa de citocinas (HOLLINGER e HUDSON, 2005; CHAMES *et al.*, 2009; CONSTANTINOU *et al.*, 2010).

Nas aplicações citadas no parágrafo anterior, a utilização dos fragmentos Fab é preferível devido a menor massa molar em comparação com as IgG, possibilitando um menor tempo de interação com o antígeno e uma maior penetração nos tecidos tumorais (PILLAY *et al.,* 2011). Hyytiä e colaboradores (2013) compararam a utilização entre um anticorpo monoclonal intacto, com os fragmentos Fab, F(ab`2) e Fab quimérico, o qual é um fragmento de camundongo contendo os domínios variáveis (VH e VL) de humanos. Nesse estudo, foi avaliada a especificidade de um imunoensaio para a quantificação do marcador bioquímico troponina cardíaca, presente no plasma

sanguíneo. Os autores reportaram maior especificidade do ensaio ao empregarem os fragmentos em relação às IgG, o que foi atribuído à ausência da região Fc, possibilitando a redução das interações não específicas.

Em determinadas situações, o fato dos fragmentos Fab apresentarem menor tempo de meia vida *in vivo*, se comparado com os anticorpos intactos, pode ser uma desvantagem. Com a finalidade de contornar esse inconveniente, têm sido estudada a associação dos fragmentos com outras moléculas, por exemplo, polietilenoglicol e albuminas (WEISSER e HALL, 2009). Dennis e colaboradores (2007) compararam a utilização do fragmento Fab livre e associado com a albumina específicos para o marcador tumoral HER2 (receptor tipo 2 do factor de crescimento epidérmico humano). Os autores reportaram que ambas as moléculas apresentaram afinidade similares com o antígeno. No entanto, foi observado que o fragmento associado com a albumina apresentou maior tempo de residência no tecido cancerígeno, proporcionando, consequentemente, maior penetração nesses tecidos.

Os anticorpos e seus fragmentos ocupam um lugar proeminente na indústria biofarmacêutica. Segundo informações de Yu (2012), estima-se que as vendas anuais de anticorpos, pelas principais empresas que os comercializam, superam 100 milhões de dólares. No mercado mundial, os anticorpos com finalidades terapêuticas movimentam 40 bilhões de dólares, os indicados para diagnóstico, 8 bilhões e os aplicados em pesquisa, 2 bilhões. Dentre esses, os monoclonais representam o segmento principal, movimentando aproximadamente 44,6 bilhões de dólares em 2011 com perspectivas para atingir 58 bilhões em 2016 (KHOURY e LOWE, 2013).

Atualmente existem vários produtos terapêuticos e de diagnósticos que contém os fragmentos Fab, aprovados pelo FDA "Food and Drug Administration". Alguns exemplos encontram-se apresentados na Tabela 2.2.

Para serem utilizados com finalidades terapêuticas esses fragmentos devem se encontrar em um grau de pureza elevado e com sua função biológica preservada (HOLLIGER e HUDSON, 2005; ELBAKRI *et al.*, 2010). Com a finalidade de se atender a esses requisitos, estudos têm sido realizados explorando diversas técnicas e condições de purificação das imunoglobulinas e de seus fragmentos.

49

Tabela 2.2: Fragmentos	Fab	aprovados	pelo	FDA	para	uso	terapêutico	(Fonte:	Adaptado	de
HANSEL <i>et al.,</i> 2010).										

Nome comercial	Descrição	Indicação	Empresa	Ano de aprovação pelo FDA
Reopro	fragmento Fab monoclonal	prevenção de isquemia cardíaca	Centocor	1994
Verluma	fragmento Fab monoclonal	detecção de células do pulmão cancerígenas	Behringer	1996
Tecnemab	fragmentos Fab e F(ab`2) monoclonais	diagnóstico de melanomas cutâneos	Sorin	1996
CEA-scan	fragmento Fab monoclonal	detecção de câncer colorretal	Immunomecics	1996
LeukoScan	fragmento Fab monoclonal	diagnóstico de infecções e inflamações em pacientes com osteomielite	Immunomecics	1997
Leucentis	fragmento Fab expresso em <i>E. coli</i> e humanizado	tratamento de degeneração macular	Genentech	2006
Cimzia	fragmento Fab expresso em <i>E.</i> coli, humanizado e associado com PEG	tratamento da doença de Crohn e artrite reumatóide	Brussels	2009

### 2.1.1. Purificação de fragmentos de IgG

O desenvolvimento de novas técnicas a serem utilizadas nos processos de recuperação e purificação de fragmentos de IgG tem sido amplamente estudado. Esse fato é decorrente da necessidade de obter fragmentos a baixo custo, com elevado rendimento e grau de pureza superior a 95%, tornando-os propícios às aplicações terapêuticas (BURNOUF e RADOSEVICH, 2001).

Tradicionalmente, os fragmentos Fab e F(ab)'<sub>2</sub> são obtidos por meio da clivagem enzimática de IgG. Posteriormente, a separação dessas biomoléculas dos meios contendo IgG não clivada e fragmentos Fc e Fc`, pode ser conduzida combinando técnicas cromatográficas, as quais possibilitam a recuperação e purificação dessas

moléculas com uma pureza elevada, assegurando a eficácia clínica dessas e diminuindo possíveis riscos de imunogenicidade (KHOURY e LOWE, 2012).

Dentre as técnicas empregadas nos processos de purificação de anticorpos e seus fragmentos, a cromatografia de afinidade é a mais difundida (AYYAR, 2012). A cromatografia de afinidade é uma técnica baseada na habilidade de biomoléculas se ligarem especificamente e de maneira reversível a substâncias imobilizadas em um suporte sólido. O ligante é um composto biológico ou químico, tal como proteínas, peptídeos, aminoácidos, corantes ou íons metálicos, o qual é imobilizado em uma matriz porosa ativada. A intensidade de associação entre o ligante e a biomolécula, indicada pelo valor da constante de dissociação, deve ser tal que permita a adsorção e a dessorção em condições que não comprometam a estabilidade da matriz ou a função biológica da proteína (JANSON e RYDÉN, 1989; TURKOVÁ, 2002; KAMIMURA e MAUGERI FILHO, 2005).

A cromatografia de afinidade foi introduzida em 1910, quando o pesquisador Starkenstein estudou a purificação da enzima amilase. No entanto, foi com a descoberta da possibilidade de se utilizar a agarose como matriz cromatográfica por Hjerten (1962) e com ativação desse suporte, empregando brometo de cianogênio (CNBr), por Porath e colaboradores, em 1967, que se difundiu a utilização da cromatografia de afinidade (MONDAL e GUPTA, 2006.)

Dentre as técnicas cromatográficas, a cromatografia de afinidade empregando ligantes bioespecíficos ou pseudobioespecíficos tem sido apresentada como uma operação que permite a separação de anticorpos e de seus fragmentos, em poucas etapas e com elevado grau de pureza. Tradicionalmente, essas biomoléculas são purificadas pela técnica de cromatografia de afinidade utilizando os ligantes bioespecíficos: proteínas A, G ou L. A proteína A é obtida da bactéria *Staphylococcus aureus* e apresenta afinidade pela porção Fc das IgG na junção entre os domínios CH2 e CH3 e pela porção Fab nas regiões variáveis das cadeias pesadas (ISHIHARA *et al.,* 2005; AYAR *et al.,* 2012)

Em relação às IgG humana, a proteína A apresenta constante de dissociação molar de  $10^{-7}$  mol/L e reconhece as subclasses IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub> e IgG<sub>4</sub> (HUSE *et al.,* 2002).

51

Essa proteína é um dos ligantes mais utilizados, em decorrência de sua capacidade de proporcionar a obtenção das IgG com 98% de pureza (GAGNON, 2012). Recentemente, Wang e colaboradores (2012) reportaram a utilização da precipitação por sulfato de amônio seguida da cromatografia de afinidade em proteína A imobilizada em matriz de agarose para a purificação do fragmento Fv ligado ao Fc (Fv-Fc), o qual foi expresso por meio da tecnologia do DNA recombinante em *Pichia pastoris*. Os autores relataram a recuperação de 55,5% do fragmento Fv-Fc, com uma pureza de 95,7%.

A proteína G, por sua vez, é isolada de linhagens de bactérias da família *Streptococcus* e é utilizada para a separação de anticorpos de origens não reconhecidas pela proteína A, por exemplo, as imunoglobulinas G de camundongos e a IgG<sub>3</sub> humana (HUSE *et al.,* 2002). A proteína G apresenta dois domínios que possuem afinidade pelo fragmento Fc das IgG e um terceiro domínio que apresenta afinidade pelo fragmento Fab (DERRICK e WIGLEY, 1994).

A proteína L é obtida do micro-organismo *Peptostreptococcus Magnus*, apresenta constante de dissociação de 10<sup>-9</sup> mol/L (ROQUE *et al.*, 2005) e se liga fortemente as regiões Fab e F(ab`2) dos anticorpos. No entanto, essa proteína apresenta baixa seletividade, uma vez que reconhece as imunoglobulinas G, D e E que apresentam em sua estrutura as cadeias leve kappa 1, 3 e 4, as quais correspondem a 50% das imunoglobulinas do plasma humano (STURA *et al.*, 2002; ROQUE *et al.*, 2007).

O emprego das proteínas A, G e L como ligante apresenta vários inconvenientes. Por serem ligantes obtidos a partir de fontes biológicas, apresentam um elevado custo envolvido na sua produção e purificação. Além disso, durante as etapas de sanitização da coluna, pode ocorrer o desprendimento desses ligantes da matriz, contaminando os anticorpos ou os fragmentos e sendo um potencial desencadeador de reações alérgicas, caso essas biomoléculas sejam empregadas em finalidades terapêuticas (BERELI *et al.*, 2005). Associado a essas desvantagens, existe o impacto negativo na estabilidade e na função biológica da biomolécula a ser purificada, uma vez que a eluição é conduzida sob valores baixos de pH (2 a 3) (VIJAYALAKSHMI, 1989; BERELI et al., 2005; ROQUE et al., 2007).

Com a finalidade de contornar os inconvenientes inerentes desses ligantes bioespecíficos, nas últimas décadas, uma série de estudos tem investigado técnicas alternativas à cromatografia de afinidade e o emprego de ligantes substitutos às proteínas A, G e L. Esses estudos têm concentrado esforços para a obtenção dos anticorpos e seus fragmentos com um grau de pureza igual ou superior ao alcançado utilizando ligantes bioespecíficos, associado, a uma elevada recuperação, reprodutibilidade e baixo custo.

Como uma alternativa à cromatografia de afinidade, Cheung e colaboradores (2003) exploraram a técnica de eletroforese capilar no fracionamento dos fragmentos Fc' e F(ab)'<sub>2</sub> dos anticorpos monoclonais do isotipo IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>2</sub> murinos. Nesse método de separação, as moléculas são separadas quanto à massa molar e quanto às suas cargas. Nesse estudo, os fragmentos F(ab`2) foram obtidos juntamente com fragmentos de menor massa molar e com IgG não clivada, mas separados do Fc`. Coleman e Mahler (2003) também utilizaram essa técnica para a separação de fragmentos Fc e Fab de anticorpo monoclonal isotipo IgG<sub>1</sub> de camundongo. Os autores relataram a obtenção dos fragmentos Fab separados da IgG não clivada e dos fragmentos Fc. Ambos os estudos demonstraram qualitativamente a separação dos fragmentos de IgG monoclonal. No entanto, não há informações quanto ao rendimento e à pureza de fragmentos Fab e F(ab`)2. Além disso, esses estudos não exploraram a separação de fragmentos de IgG policional e de IgG de outras fontes.

Outra alternativa à cromatografia de afinidade com ligantes bioespecíficos é a cromatografia em hidroxiapatita. A adsorção de proteínas nesse mineral envolve interações mistas da proteína com o grupamento fosfato e com os íons cálcio. Essas interações correspondem às eletrostáticas entre o grupamento fosfato e resíduos de aminoácidos carregados positivamente e acessíveis na proteína. As outras interações envolvidas consistem nas de coordenação entre os íons cálcio e os grupamentos carboxila e fosfórico das proteínas (ROQUE *et al.,* 2007; AYYAR *et al.,* 2012). Gagnon e colaboradores (2009) avaliaram a técnica de cromatografia em hidroxiapatita para purificação dos fragmentos Fab, obtidos por meio da clivagem enzimática de IgG

monoclonal quimérica. Os autores relataram a recuperação dos fragmentos Fab, a partir de meios contendo fragmentos Fc e IgG intacta, com um grau de pureza de 96%.

Nos anos de 2009 e 2010, Yu e Ghosh propuseram a integração das operações de purificação de IgG humana a partir do plasma humano, fragmentação da IgG e separação do fragmento Fab, em uma única etapa. Nesses estudos, a IgG humana foi adsorvida em membranas microporosas por meio de interações hidrofóbicas (YU e GHOSH, 2009) ou por troca aniônica (YU e GHOSH, 2010), enquanto as impurezas foram eliminadas na etapa de lavagem. Posteriormente, uma solução contendo a enzima papaína foi percolada através da membrana, possibilitando a fragmentação das IgG adsorvidas e a recuperação dos fragmentos Fab nas etapas de lavagem, enquanto os fragmentos Fc ficaram adsorvidos. Os fragmentos foram obtidos com uma pureza de 82,1%, quando a cromatografia por interação hidrofóbica foi utilizada na purificação da IgG (YU e GHOSH, 2009), e com 95% de pureza, ao se utilizar a cromatografia de troca iônica (YU e GHOSH, 2010).

Recentemente, Fischer e colaboradores (2013) estudaram a purificação do fragmento Fab expresso no periplasma de *E. coli* em sistemas micelar de duas fases aquosas com nanopartículas magnéticas. Os autores relataram a recuperação de 70% dos fragmentos com pureza de 98%.

Além das técnicas alternativas à cromatografia de afinidade citadas anteriormente como a eletroforese capilar, cromatografia de troca-iônica e hidrofóbica, nos últimos anos, estudos têm sido realizados abordando o desenvolvimento e o emprego dos denominados ligantes pseudobioespecíficos para a purificação de anticorpos e fragmentos nativos e recombinantes. O termo ligante pseudobioespecífico foi introduzido por Vijayalakshmi (1989) e compreende moléculas biológicas, por exemplo, aminoácidos, e moléculas não biológicas tais como corantes e íons metálicos imobilizados. As interações envolvidas na adsorção de uma biomolécula nos ligantes pseudobioespecíficos incluem complementaridade de estrutura, ligações de hidrogênio, forças de van der Waals e interações hidrofóbicas, eletrostáticas, ligações de biomoléculas em ligantes bioespecíficos, no entanto, divergem quanto à intensidade

(VIJAYALAKSHMI, 1989; ROQUE et al. 2007).

Apesar dos ligantes pseudobiespecíficos apresentarem menor afinidade pela biomolécula alvo, quando comparados aos bioespecíficos, em muitos casos, podem propiciar uma separação com elevado grau de pureza, combinando as condições em que a cromatografia é conduzida, tais como, tipo de tampão, força iônica e valor de pH. Os ligantes pseudobioespecíficos têm sido amplamente estudados por apresentarem um baixo custo, serem robustos e apresentarem resistência às condições de sanitização e esterilização da coluna (VIJAYALAKSHMI, 1989; KHOURY e LOWE, 2013).

Um ligante pseudobioespecífico utilizado na purificação de anticorpos, fragmentos Fab, F(ab`)<sub>2</sub> e scFv é o tiofílico. A cromatografia de afinidade tiofílica foi introduzida por Porath e colaboradores (1975) e apresenta como pontos favoráveis a sua utilização o baixo custo, a boa especificidade, a estabilidade química dos ligantes e o fato da eluição das proteínas adsorvidas ser conduzida em baixas concentrações de sal, o que preserva a funcionalidade biológica dessas (LIN *et al.*, 2013; AYYAR *et al.*, 2012). Essa técnica apresenta como princípio a adsorção de proteínas aos ligantes que estruturalmente contêm átomo enxofre, tais como o 2-mercaptoethanol, na presença de altas concentrações de sais liotróficos, os quais expõem as regiões hidrofóbicas das proteínas (BOSCHETTI, 2001; ROQUE, *et al.*, 2007; AYYAR, *et al.*, 2012).

Apesar de a cromatografia tiofílica apresentar características favoráveis ao seu emprego na purificação de biomoléculas, a necessidade de elevadas concentrações de sal no tampão de adsorção limita a sua utilização. Essa desvantagem está relacionada ao fato de elevadas concentrações salinas acarretarem a precipitação de proteínas, limitando a concentração dessas na solução que é injetada na coluna. Além disso, o impacto negativo ao meio-ambiente do descarte do tampão contendo altas concentrações de sal limita a utilização dessa cromatografia em larga escala (BOSCHETTI, 2001). Aguns trabalhos reportam a realização da cromatografia tiofílica empregando ligantes contendo anéis sulfúricos e heterocíclicos, tais como o mercapto metil imidazol (COFFINIER e VIJAYALAKSHMI, 2004), o 2-mercapto-benzotiazol (QIAN *et al.*, 2008) e o ácido 2-mercaptonicotínico (QIAN *et al.*, 2010) para a purificação da IgG

na ausência ou em baixas concentrações de sal.

Recentemente, Lin e colaboradores (2013) empregaram o ligante tiofílico, 2mercapto-1-metil imidazol, imobilizado em partículas magnéticas, na purificação de IgG a partir do plasma humano na ausência de sal. Os autores demonstraram que esse ligante apresenta afinidade pelos fragmentos Fab e F(ab`)2 dessa proteína, o que faz desse um possível adsorvente a ser utilizado para purificação de fragmentos de IgG. No entanto, nesse trabalho não são apresentados a pureza ou o fator de purificação dos fragmentos Fab e F(ab`)2.

Os peptídeos sintéticos outra classe de ligantes representam pseudobioespecíficos que têm sido propostos como alternativos às proteínas A, G e L. Nas últimas décadas, os avanços na modelagem molecular computacional têm permitido a identificação dos aminoácidos envolvidos na interação entre os anticorpos e os ligantes bioespecíficos (BRANCO et al., 2012). Associada a essa identificação, tal ferramenta computacional tem possibilitado o desenvolvimento de ligantes pseudobioespecíficos que apresentam uma estrutura química contendo esses aminoácidos. Assim, o emprego de tais ligantes permite alcançar uma seletividade similar à obtida quando se utiliza os ligantes biológicos (ROQUE et al., 2007).

Alguns exemplos desses peptídeos são o ligante sintético 8/7 que mimetiza a interação entre a proteína L e o fragmento Fab (ROQUE *et al.,* 2005) e é constituído por grupamentos polares, tais como o 4-aminobenzamida e o 4- ácido-amino-butírico e grupos alifáticos e aromáticos. Outro exemplo é o DAAG que mimetiza a interação entre proteína A e o fragmento Fc e é constituído pelos aminoácidos L-arginina e L-glicina e polos ácido aromático 2,6-di-t-butil-4-hidroxibenzil acrilato (LUND *et al.,* 2012).

Khoury e Lowe (2013) avaliaram o desempenho de um peptídeo sintético, o qual mimetiza os aminoácidos presentes na proteína G que apresentam afinidade pelo fragmento Fab das IgG. Nesse estudo, foi demonstrado que o ligante sintético apresentou estabilidade, permitindo a reutilização em dez ciclos de purificação em pequena escala, foi capaz de adsorver imunoglobulinas e recuperar IgG e Fab expressos em células animais e em leveduras, com elevado grau de pureza.

Algumas proteínas não apresentam em sua estrutura aminoácidos os quais

possuem afinidade por um determinado ligante, dificultando a purificação dessas por técnicas que se baseiam nessa afinidade. Uma estratégia que permite contornar essa dificuldade consiste na fusão de uma sequência peptídica em uma proteína. Essa modificação na estrutura das biomoléculas é realizada por meio da tecnologia do DNA recombinante e tem permitido a recuperação dessas com um elevado fator purificação (ZHAO *et al.,* 2009a). No entanto, o emprego dessa estratégia exige a aplicação de técnicas que permitam a clivagem da sequência peptídica inserida para aplicação terapêutica da biomolécula (ROY e GUPTA, 2003).

Um exemplo de sequência peptídica inserida em biomoléculas é a proteína inteína. Wu e colaboradores (2011) reportaram a purificação dos seguintes biocompostos expressos no periplasma de *E.coli:* a cadeia leve kappa e o domínio variável da cadeia pesada (VH) de imunoglobulinas humanas específicos para fator de crescimento epitelial humano. Nesse estudo, os autores introduziram nas biomoléculas a proteína inteína, pretendendo explorar a afinidade de uma coluna de quitina pela maltose presente na inteína.

Os íons metálicos são ligantes pseudobioespecíficos empregados em IMAC. Essa técnica foi introduzida por Porath e colaboradores (1975) e é uma alternativa promissora para a recuperação de anticorpos (VANÇAN *et al.*, 2002; RIBEIRO *et al.*, 2008; BRESOLIN *et al.*, 2010), fragmentos recombinantes (ZHAO *et al.* 2009a) e não recombinantes (TODOROVA-BALVAY *et al.*, 2004). IMAC tem como princípio a afinidade entre os íons metálicos imobilizados em matriz sólida por determinados resíduos de aminoácidos localizados na superfície de uma biomolécula em solução (PORATH *et al.*, 1975).

Xiang e colaboradores (2002) relataram a purificação do fragmento Fab expresso em *E. coli*, contendo a sequência de histidina. Nesse estudo, os autores exploraram a afinidade do íon metálico níquel quelatado ao ácido nitrilotriacético (NTA) pelos resíduos de histidina, possibilitando a obtenção da biomolécula alvo com pureza de 90%.

Todorova-Balvay e colaboradores (2004) demonstraram a potencialidade da utilização dos quelatos IDA-Zn(II), e IDA-Co(II) imobilizados em uma matriz de agarose

57

para a separação dos fragmentos F(ab`)<sub>2</sub> de IgG humana policional na presença dos fragmentos Fc` e de IgG não clivada. Nesse estudo, os fragmentos Fc` e a IgG não clivada foram adsorvidos na matriz enquanto a biomolécula alvo (F(ab`)<sub>2</sub>) foi obtida nas frações não retidas na coluna. No entanto, esse trabalho não apresenta relatos quanto ao rendimento e grau de pureza dos fragmentos obtidos.

Em trabalho recente, da Silva e colaboradores (2014) reportaram a utilização do adsorvente agarose-TREN-Ni(II) para purificação de fragmentos Fab adicionados artificialmente em extrato de soja, no qual foi relatada a recuperação dessa biomolécula nas frações não retidas com pureza superior a 90%.

Baseando-se nos trabalhos de Todorova-Balvay e colaboradores (2004) e da Silva e colaboradores (2014), é possível inferir que os quelatos metálicos são potenciais ligantes para serem empregados nos processos de purificação de fragmentos Fab de IgG por IMAC.

## 2.2. Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados

Os íons metálicos imobilizados foram introduzidos em técnicas de separação de biomoléculas por Porath e colaboradores (1975). Esses pesquisadores estudaram a separação de metaloproteínas empregando a técnica de cromatografia de afinidade com íons metálicos imobilizados em um agente quelante, introduzindo a sigla IMAC (*Immobilized Metal-Ion Affinity Chromatography*).

A purificação de biomoléculas na técnica de IMAC se baseia na afinidade seletiva dos íons metálicos, imobilizados em matriz sólida, por determinados aminoácidos acessíveis e presentes na superfície de moléculas em solução (PORATH, 1988). Essa afinidade é decorrente do fato de determinados resíduos de aminoácidos, expostos na superfície de biomoléculas, comportarem-se como base de Lewis, ou seja, doarem elétrons para os íons metálicos imobilizados em um suporte sólido (PORATH *et al.,* 1975).

A técnica IMAC tem sido amplamente estuda, sendo reportada como eficiente na purificação de biomoléculas naturais e recombinantes (ZHAO *et al.,* 2009a), na purificação de células (TETALA *et al.,* 2013), na eliminação e inativação de vírus

(ROBERTS et al., 1994), na remoção de endotoxinas (ZIMMERMAN et al, 2006) e na caracterização de peptídeos (WANG et al., 2012). Essas diversas aplicações da IMAC decorrem das várias vantagens que essa técnica proporciona. Entre elas, tem-se a seletividade elevada, a qual pode ser alcançada escolhendo adeguadamente o guelato metálico, os valores de pH, tipo, concentração e força iônica do tampão e a temperatura em que a cromatografia é conduzida (UYGUN et al., 2012). Além disso, diferentes íons metálicos podem ser facilmente imobilizados em uma mesma matriz, possibilitando que diversos sejam testados para selecionar os que proporcionam uma melhor purificação da molécula de interesse (PORATH, 1988). Outro aspecto positivo da técnica de IMAC consiste no fato de as moléculas adsorvidas poderem ser facilmente eluídas por meio da alteração no valor de pH, adição de agentes competitivos ou agentes quelantes mais fortes (CHEUNG et al., 2012). Outra característica favorável a utilização da IMAC envolve a possilidade da inserção de uma seguência de seis histidinas em proteínas que não apresentam naturalmente aminoácidos doadores de elétrons para os quelatos metálicos, permitindo que biomoléculas modificadas possam ser purificadas por IMAC, tais como a  $\beta$ -galactosidase (KAMERKE, *et al.*, 2013), lisozima (LAMPPA *et al.*, 2013), e fragmentos scFv (ZHAO et al., 2009a). Além disso, IMAC apresenta baixo custo, seletividade elevada e resistência à degradação química e microbiológica durante a estocagem (PORATH, 1988; CHEUNG et al., 2012).

Embora a técnica de IMAC apresente essas várias vantagens, há algumas limitações na sua utilização. Entre elas, a possibilidade do desprendimento dos íons metálicos quelatados, acarretando a contaminação da proteína de interesse e, consequentemente, comprometendo a utilização terapêutica dessas, uma vez que esses metais são tóxicos e muitos são cancerígenos (CHEUNG *et al.*, 2012). No entanto, esse inconveniente pode ser contornado por meio da eliminação dos íons metálicos utilizando a diafiltração ou injetando a solução em uma coluna com um agente pentadentado imobilizado, como o TED, o qual captura os íons metálicos desprendidos. Outra desvantagem da técnica de IMAC é a possível captura do íon metálico pela proteína de interesse, influenciando negativamente a função biológica e impossibilitando a sua aplicação terapêutica. Esse fenômeno é denominado "Metal-ion

transfer" e ocorre quando a proteína apresenta intensa afinidade pelo metal (PORATH, 1992; GUTIÉRREZ *et al.,* 2007; BRESOLIN *et al.,* 2009).

#### 2.2.1. Princípios básicos de IMAC

IMAC pode ser definida como uma operação de separação que emprega um agente quelante ligado covalentemente em uma estrutura sólida, o qual é constituído por átomos de nitrogênio, oxigênio e/ou enxofre que doam elétrons para um íon metálico, por meio de ligações de coordenação, resultando na formação dos ligantes, denominados de quelatos metálicos. Nessa técnica, os quelatos metálicos apresentam seus sítios de coordenação ocupados por moléculas do solvente e do tampão até que ocorra o deslocamento dessas por compostos que apresentem maior afinidade pelo ligante (ROY e GUPTA, 2003; UEDA *et al.*, 2003; GUTIERREZ *et al.*, 2007; BRESOLIN *et al.*, 2009; KAGEDAL, 2011).

Na técnica de IMAC, a adsorção de proteínas requer a presença de determinados resíduos de aminoácidos desprotonados na superfície dessas, podendo, portanto, doar elétrons para o íon metálico imobilizado. Os resíduos dos aminoácidos histidina, cisteína, tirosina, triptofano, ácido glutâmico, ácido áspartico, metionina, lisina e arginina podem ser responsáveis pela adsorção de proteínas na técnica de IMAC (ARNOLD, 1991). No entanto, para os íons metálicos de transição o grupamento imidazol da histidina é reportado como prinicpal doador de elétrons. Isso é decorrente do grupamento imidazol da histidina apresentar pKa igual a 6 (quando a histidina está livre em solução), enquanto os demais aminoácidos apresentam um elevado valor de pka, por exemplo o grupamento tiol da cisteína apresenta pKa de 9,0 e o indol do triptofano, pKa de 15,0 (TODOROVA e VIJAYALAKSHMI, 2006). Portanto, em valores de pH similares aos fluidos biológicos, nos quais a biomolécula é estável, o grupamento imidazol da histidina se encontra desprotonado, podendo participar de ligações de coordenação com o metal quelatado (TODOROVA e VIJAYALAKSHMI, 2006; KAGEDAL, 2011).

A separação de biocompostos empregando a técnica de IMAC compreende três etapas: imobilização do íon metálico ao agente quelante, a adsorção de proteínas ao

quelato metálico e a eluição dessas (PRASANA e VIJAYALAKSHMI, 2010).

#### 2.2.2. Ligação do íon metálico ao agente quelante

Anteriormente à imobilização de íons metálicos em uma matriz sólida, é necessário que determinados compostos, denominados de agentes quelantes, sejam acoplados à matriz por meio de ligações covalentes. Esses agentes quelantes apresentam em suas estruturas átomos de oxigênio, enxofre ou nitrogênio, os quais atuam como base de Lewis, doando elétrons aos íons metálicos, formando ligações de coordenação com esses íons e resultando na imobilização desses na matriz (PORATH *et al.,* 1975; PORATH, 1988).

Alguns compostos empregados como agentes quelantes na técnica de IMAC são o IDA (CASEY *et al.*, 1995; VANÇAN *et al.*, 2002; CARVALHO *et al.*, 2014), o TREN (RIBEIRO *et al.*, 2008; de GOES *et al.*, 2010), o TED (BRESOLIN *et al.*, 2010; MUSA *et al.*, 2014), o CM-Asp (BRESOLIN *et al.*, 2010) e o NTA (ANURAJ *et al.*, 2012; KIRK, 2014; DAVIES *et al.*, 2014). Os agentes quelantes são classificados de acordo com o número de sítios de coordenação que apresentam para quelatar um íon metálico, ou seja, de acordo com o número de átomos que podem doar elétrons para o íon metálico (PORATH e OLIN, 1983). O IDA é classificado como um agente quelante tridentado, por possuir três sítios de coordenação para quelatar um íon metálico. O TREN e o NTA são denominados de agentes quelantes tetradentados, uma vez que apresentam quatro sítios de coordenação para quelatar um íon metálico. Já o TED é designado de agente quelante pentadentado, pois disponibiliza cinco sítios de coordenação para quelatar um íon metálico (PORATH e OLIN, 1983).

O número de átomos que podem doar elétrons para o íon metálico, assim como o tipo, são responsáveis pela estabilidade e força do quelato metálico formado. Normalmente, quanto maior o número de átomos que podem doar elétrons para o íon metálico, maior a estabilidade do quelato metálico formado e menor a interação do metal com as proteínas (PORATH, 1988; TODOROVA e VIJAYALAKSHMI, 2006). De acordo com Porath, 1988, a afinidade dos ligantes íon metálico(II)-agente quelante por proteínas segue a seguinte ordem: íon metálico(II)-IDA > íon metálico(II)-NTA > íon

metálico(II)-CM-Asp > íon metálico(II)-TED.

Sharma e Agarwal (2002), em um estudo comparativo, avaliaram a influência da força iônica, do pH e da concentração dos íons metálicos níquel e cobre nos quelatos metálicos formados entre esses e o IDA e o TREN. Os autores reportaram que a quantidade de íon metálico quelatado está associada ao pH, uma vez que esse influencia na desprotonação dos átomos doadores de elétrons do agente quelante. Além disso, essa quantidade está relacionada com a força iônica, uma vez que altas concentrações de íons do sal podem suprimir as interações de coordenação entre o íon metálico e o agente quelante.

O agente quelante mais utilizado em IMAC é o IDA (Figura 2.5). Esse composto apresenta em sua estrutura dois átomos de oxigênio e um átomo de nitrogênio que quelatam o íon metálico (ZACHARIOU e HEARN, 1996; GABERC-POREKAR e MENART, 2001).



**Figura 2.5:** Estrutura do agente quelante IDA acoplado a uma matriz S e com um íon metálico hexacoordenado (M<sup>2+</sup>) imobilizado. (Fonte: Adaptado de GABERC-POREKAR e MENART, 2001).

Embora o agente quelante tridentado IDA apresente o uso difundido nos processos de separação por IMAC, alguns estudos tem demonstrado a obtenção da proteína de interesse com maior grau de pureza quando se substitui os agentes quelantes tridentados pelos tetradentados e pentadentados.

Bresolin e colaboradores (2010) avaliaram o efeito dos agentes quelantes IDA, CM-Asp, NTA e TED imobilizados em agarose e quelatados aos íons metálicos Ni(II), Cu(II), Co(II) e Zn(II) na purificação de anticorpos monoclonais. Os autores relataram que os géis contendo o IDA como agente quelante proporcionaram a maior retenção de IgG, porém a pureza da proteína obtida foi baixa. Por outro Iado, o CM-Asp possibilitou a recuperação dos anticorpos com um fator de purificação de 85,9.

de Góes e colaboradores 2010, em um estudo comparativo, avaliaram o efeito dos agentes quelantes CM-Asp, IDA, TREN e TED ligados ao íon metálico níquel na purificação de insulina humana recombinante contendo, em sua estrutura, a sequência de seis histidinas. Os autores relataram a obtenção dessa biomolécula com maior grau de pureza, ao se utilizar o agente quelante CM-Asp, em comparação com os demais.

Ming 2011, em estudo comparativo, avaliou a purificação de IgG a partir do plasma humano, empregando os quelatos CM-Asp-Co(II) e IDA-Co(II). Nesse estudo, foi relatado a recuperação de IgG com grau de pureza similar, ao sem empregar ambos os quelatos.

Além dos trabalhos Bresolin e colaboradores (20010), de Góes e colaboradores 2010 e Ming (2011), outros estudos empregam o adsorvente agarose-CM-Asp-Co(II) para a purificação de proteínas recombiantes contendo, em sua estrutura, a sequência de seis histidinas, tais como a caltrina (PHAN *et al.*, 2003), a tubulina humana (MINOURA *et al.*, 2013), a proteína viral 22 (DEWBERRY *et al.*, 2012), receptores acoplados a proteína G (SHIROISHI, *et al.*, 2011) e o receptor do leucotrieno B4 (HORI *et al.*, 2010). Baseando-se nesses estudos, é possível inferir que o agente quelante CM-Asp na técnica de IMAC é empregado na recuperação possibilitando elevado grau de pureza de anticorpos e proteínas recombinantes. Esse agente (Figura 2.6), estruturalmente, apresenta três átomos de oxigênio e um de nitrogênio, os quais se ligam por coordenação do íon metálico. Portanto, os dois sítios remanescentes do íon metálico são responsáveis pela adsorção das proteínas em solução (CHAGA *et al.*, 1999).

Os íons metálicos podem ser classificados em três categorias: ácidos fracos, fortes e intermediários, baseando-se no princípio de ácidos e bases duros e moles, (HSAB – Hard and Soft Acids and Bases) (PEARSON, 1968). De acordo com esse princípio, em uma ligação entre dois átomos, um se comporta como ácido de Lewis e o outro como base de Lewis. Quando solvatados por moléculas de água, os íon metálicos se comportam como ácidos de Lewis, recebendo elétrons dessas. De modo análogo, se os íons estiverem em um meio contendo uma base mais forte que as moléculas de

água, há a formação de um complexo de coordenação, o qual é denominado de quelato metálico se a base apresentar dois ou mais átomos doadores de elétrons (GABERC-POREKAR e MENART, 2001).





O princípio de ácidos e bases duros e moles também determina que os ácidos duros formem ligações estáveis com as bases duras, enquanto, os moles formem ligações estáveis com bases moles (PEARSON, 1968). Segundo esse princípio, os íons metálicos são classificados como ácidos e bases duros, intermediários e moles (Tabela 2.3).

Os íons metálicos classificados como duros formam ligações de coordenação estáveis com bases duras que apresentam em sua estrutura átomos de oxigênio, nitrogênio alifático e/ou fósforo (PORATH, 1992). Essa propriedade foi explorada no estudo de Lv e colaboradores (2013) para fracionar e caracterizar peptídeos de extrato de soja hidrolisado. Para isso, os autores se basearam na afinidade do quelato IDA-Ca(II) pelo oxigênio do grupamento carboxila dos aminoácido glutamina e ácido aspártico.

Os íons metálicos classificados como moles se ligam covalentemente com átomos de enxofre, podendo ser utilizados para a separação de proteínas que apresentam resíduos de aminoácidos contendo esse átomo (PORATH, 1992; TODOROVA e VIJAYALAKSMI, 2006).

Os íons metálicos intermediários formam ligações de coordenação estáveis com bases que apresentam em sua estrutura átomos de nitrogênio aromático acessíveis.

64

Dentre esses íons, os metais de transição Cu(II), Zn(II), Ni(II), Co(II) são os mais empregados. Tais íons metálicos imobilizados adsorvem biomoléculas, principalmente, por meio de ligações de coordenação com os grupamentos imidazol, indol e tiol de resíduos dos aminoácidos histidina, triptofano e cisteína, respectivamente, presentes na superfície de biomoléculas (PORATH e OLIN, 1983). Por outro lado, os íons Fe(III) e Al(III) apresentam uma afinidade peculiar pelos fosfatos e fosfoésteres, sendo utilizados para o fracionamento de fosfoproteínas.

**Tabela 2.3:** Classificação dos íons metálicos e seus principais ligantes. (Fonte: Adaptado de MRABET e VIJAYALAKSHMI, 2002).

Ácidos de Lewis	Base de Lewis	Classificação
H(I), Li(I), Na(I), Mg(II), Ca(II), Mn(II), Cr(III), Co(III), Al(III), Ga(III), La(III), Nd(III), Eu(III)	H <sub>2</sub> O, OH, OH <sup>-</sup> , RO <sup>-</sup> , NH <sub>3</sub> , RNH <sub>2</sub> , CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> , RCOO <sup>-,</sup> átomos de oxigênio, nitrogênio alifático e fósforo	Duros
Zn(II), Cu(II), Fe(II), Fe(III), Ni(II), Co(III), Sn(II), Pb(II), Rh(III), Ir(III), In(III), Ru(III)	N <sub>2</sub> , N <sub>2</sub> <sup>-</sup> , N <sub>3</sub> <sup>-</sup> , Br <sup>-</sup> , nitrogênio aromático	Intermediários
Cu(I), Ag(I), Au(I), Ti(I), Pd(II), Pt(II), Cd(II), Hg(I), Hg(II)	RSH, RS, R <sub>2</sub> S, CN <sup>-</sup> , H <sup>-</sup> , I <sup>-,</sup> átomo de enxofre	Moles

Baseando-se nas informações apresentadas acima, é possível inferir que os íons metálicos são selecionados para um processo de purificação considerando a composição de aminoácidos das proteínas. Os postulados do estudo apresentado por Sulkowski (1989) são uma relevante ferramenta para predizer e elucidar resultados de purificação de proteínas que apresentem composição de aminoácidos conhecida.

Sulkowski (1989) estudou a adsorção de proteínas de estrutura química conhecidas, tais como RNase pancreática bovina, citocromo c, lizosima, albumina e interferon nos ligantes IDA-Co(II), IDA-Cu(II), IDA-Ni(II), IDA-Zn(II). Nesse estudo, foi evidenciada a relevância do par de elétrons presente no nitrogênio do anel imidazol da

histidina, assim como do número de moléculas desse aminoácido na superfície das biomoléculas, na adsorção dessas aos quelatos metálicos. Nesse estudo, foram estabelecidas as regras que regem a afinidade entre proteínas e esses quelatos metálicos e que estão resumidas na Tabela 2.4.

		de protonido	poloo quolut	
Ligantes	IDA-Cu(II)	IDA-Ni(II)	IDA-Zn(II)	IDA-Co(II)
-Histidina-	+	-	-	-
-Histidina-(X) <sub>n</sub> -Histidina-	+	+	-	-
-Histidina-(X) <sub>n</sub> -Histidina-n(2,3);a-hélice	+	+	+	+
-Histidina Histidina- (enovelamento)	+	+	+	+

Tabela 2.4: Reconhecimento dos resíduos de hisitdinas de proteínas pelos quelatos IDA-Me<sup>2+</sup>.

Me<sup>2+:</sup> Cu(II), Ni(II), Zn(II) e Co(II),

+: resíduos de histidina se ligam ao íon metálico;

-: resíduos de histidina não se ligam ao íon metálico

O estudo realizado por Sulkowski (1989) revela que íons metálicos ligados a um mesmo agente quelante apresentam afinidades distintas por proteínas, inclusive os que são classificados em um mesmo grupo. Essas variações são derivadas das diferentes interações que ocorrem entre os quelatos metálicos e os resíduos de aminoácidos doadores de elétrons, envolvidas no processo de adsorção das proteínas nesses ligantes (KAGEDAL, 2011).

#### 2.2.3. Adsorção de proteínas ao quelato metálico

Em IMAC, a adsorção de proteínas ao quelato metálico envolve as interações de coordenação, assim como as eletrostáticas, as de carga induzida e as hidrofóbicas (Figura 2.7), entre grupamentos doadores de elétrons situados na superfície das proteínas e os sítios de coordenação do íon metálico quelatado (UEDA *et al.,* 2003). Essas interações podem ser minimizadas ou intensificadas pelo valor de pH, tipo de tampão, temperatura e força iônica em que a cromatografia é conduzida (VIJAYALAKSHMI, 1989; UEDA *et al.,* 2003).



**Figura 2.7:** Tipos de interações entre proteína e o metal quelatado (M) a uma matriz com um agente quelante imobilizado (S-im) e a proteína. (a) Interação eletrostática e de carga induzida, (b) ligação de coordenação, (c) ligação covalente. (Fonte: Adaptado de VIJAYALAKSHMI, 1989).

Dependendo da concentração de sal e do valor de pH em que o processo de purificação é conduzido, quelatos metálicos atuam como trocadores iônicos, podendo adsorver proteínas por meio de interações eletrostáticas. Com a finalidade de suprimir as interações eletrostáticas, assim como aumentar a seletividade do quelato metálico e aumentar a estabilidade da ligação entre a biomolécula e o íon metálico, é adicionado sal ao tampão de adsorção, geralmente cloreto de sódio, na concentração de 0,5 a 1,0 mol/L (PORATH, *et al.*, 1975; PORATH e OLIN, 1983).

Os tampões de equilíbrio empregados na técnica de IMAC desempenham uma função relevante na adsorção e no fracionamento de proteínas. Esses podem suprimir ou facilitar o reconhecimento e a interação entre as proteínas e o quelato metálico (MRABET e VIJAYALAKSHMI, 2002; KAGEDAL, 2011). Em IMAC normalmente são empregados os tampões zwiteriônicos ("Good's buffers") como MOPS (ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico), MES (ácido 2-[N-morfolino] etanosulfônico) e HEPES (ácido 2-[N-hidroxietil] piperazina-N'-[3-etanolsulfônico]) e os não zwiteriônicos fosfato de sódio, acetato de sódio e Tris-HCI (TODOROVA e VIJAYALAKSHMI, 2006).

## 2.2.4. Eluição das proteínas adsorvidas ao quelato metálico formado por íons metálicos de transição

A eluição das proteínas adsorvidas ao quelato metálico pode ser realizada empregando diversos métodos, tais como, adição de agentes competitivos, alteração no valor de pH e adição de um agente quelante na fase móvel (KAGEDAL, 2011).

A adição de agentes competitivos na fase móvel baseia-se na afinidade que determinadas substâncias apresentam pelo quelato metálico, de maneira que a proteína adsorvida é deslocada e o agente competidor se liga ao íon metálico (WONG *et al.*, 1991). Normalmente a eluição por agentes competitivos envolve o emprego do imidazol. Essa substância é caracterizada por apresentar pKa de 6,95 a 25°C (TODOROVA e VIJAYALAKSHMI, 2006). Portanto, em valores de pH neutro ou alcalino, as espécies doadoras de elétrons encontram-se desprotonadas, podendo se ligar ao agente quelante (PORATH e OLIN, 1983; TODOROVA e VIJAYALAKSHMI, 2006).

A eluição das proteínas conduzida pelo abaixamento do valor de pH da fase móvel é baseada na protonação dos grupos doadores de elétrons dos resíduos de aminoácidos envolvidos na adsorção das proteínas. Desse modo, a ligação entre a proteína e o quelato metálico é enfraquecida, acarretando o desprendimento da proteína para a fase móvel. No entanto, essa estratégia de eluição deve ser evitada quando se trata de proteínas sensíveis a baixos valores de pH. Nesses casos, a adição de agentes competitivos é preferível (TODOROVA e VIJAYALAKSHMI, 2006; PRASANNA e VIJAYALAKSHMI, 2010).

Outra estratégia de eluição consiste em adicionar à fase móvel um agente quelante mais forte que o ligado à matriz. Normalmente, emprega-se o ácido etilenodiamino tetraácido (EDTA), o qual quelata eficientemente os íons metálicos divalentes. Nesse método de eluição, toda a proteína adsorvida é desprendida juntamente com o metal. Portanto, trata-se de um método não seletivo e que limita a aplicação terapêutica da biomolécula, uma vez que ela é recuperada juntamente com o metal e com outras proteínas que possam estar adsorvidas (SULKOWSKI, 1985).

Baseando-se nas particularidades da técnica de IMAC apresentadas nos itens

anteriores é possível concluir que a utilização dessas nos processos de purificação de biomoléculas envolve a combinação entre o agente quelante, o íon metálico e as condições cromatográficas, tais como tampão de adsorção, pH, força iônica e estratégia de eluição para proporcionar a recuperação da biomolécula de interesse com o grau de pureza adequado a sua aplicação.

## 2.2.5. Aplicação dos íons metálicos de transição em IMAC para purificação de biomoléculas

Nos estudos explorando a utilização da técnica de IMAC, os metais de transição Cu(II), Ni(II), Zn(II), Co(II) são normalmente os mais empregados. Uma série de estudos tem demonstrado a potencialidade da utilização desses metais no isolamento, a partir de meios complexos, biocompostos os quais apresentam em sua composição resíduos de histidina acessíveis.

Chaga e colaboradores (1999) avaliaram a purificação da enzima lactato desidrogenase nos ligantes CM-Asp-Ni(II), CM-Asp-Co(II), CM-Asp-Zn(II). Os autores recuperaram essa biomolécula com uma pureza superior a 95%.

Vançan e colaborados (2002) estudaram a purificação de IgG a partir do plasma humano empregando os quelatos metálicos IDA-Cu(II), IDA-Co(II), IDA-Ni(II) e IDA-Zn(II). Os autores relataram a recuperação de mais de 80% das IgG ao seu utilizar os ligantes IDA-Ni(II) e IDA-Zn(II), 74,7% para o ligante IDA-Cu(II) e 35,2% para o IDA-Co(II), utilizando o tampão MOPS (25 mmol/L), na presença de NaCI (1 mol/L) pH 7,5 e a eluição por aumento da concentração de imidazol (2 a 100 mmol/L). Os autores relataram a potencialidade de utilização desses ligantes para a purificação de IgG demonstrando qualitativamente a recuperação dessas biomoléculas na ausência da albumina (impureza) nas frações eluídas com baixas concentrações de imidazol.

Phan e colaboradores (2003), em um estudo comparativo, avaliou a eficiência dos quelatos metálicos NTA-Ni(II) e CM-Asp-Co(II) na purificação da proteína caltrina contendo uma sequência de seis histidinas expresso em baculovírus. Os autores relataram que o quelato NTA-Ni(II) proporcionou a recuperação dessa proteína na presença de impurezas, enquanto o CM-Asp-Co(II) possibilitou a recuperação da

proteína de interesse com uma pureza superior a 99%. Esses resultados foram relacionados ao fato do íon metálico níquel requerer dois resíduos de histidina para a ligação de coordenação. Por outro lado, o cobalto requer a presença de dois resíduos de histidina espacialmente situadas em uma  $\alpha$ -hélice e entre dois ou três aminoácidos disponíveis para a ligação de coordenação.

Jiang e colaboradores (2004) estudaram a utilização dos quelatos metálicos IDA-Cu(II), IDA-Co(II), IDA-Ni(II) e IDA-Zn(II) na purificação do vírus da herpes tipo I. Os autores relataram a eficácia do ligante IDA-Co(II) na purificação do vírus por proporcionar a recuperação de 78% da biomolécula com redução de 96% do teor de proteínas contaminantes e DNA.

Yavuz e colaboradores (2012) investigaram a purificação de IgG a partir do plasma humano utilizando membranas (poly(2-hydroxyethyl methacrylate)) PHEMA contendo os íons metálicos Zn(II), Ni(II), Cu(II) e Co(II). Os autores observaram que o metal Cu(II) proporcionou maior adsorção de IgG em relação aos demais. Isso foi atribuído ao fato do cobre requerer um resíduo de histidina disponível na superfície da proteína para a ligação de coordenação, enquanto os demais metais de transição estudados requerem pelo menos dois resíduos. Nesse estudo, 84,5% da IgG presente no plasma foi recuperada com 94,1% de pureza.

A técnica de IMAC também é empregada na cromatografia negativa em que a biomolécula de interesse é recuperada nas frações não retidas, enquanto os contaminantes são adsorvidos pelos agentes quelantes. Alguns estudos têm demonstrado a aplicação e a potencialidade da cromatografia negativa na purificação da enzima aprotinina (de GENARO *et al.*, 2002), da IgG (BRESOLIN *et al.*, 2012) e dos fragmentos F(ab`)2 de IgG (TODOROVA-BALVAY *et al.*, 2004) e dos fragmentos Fab de IgG (da Silva *et al.*, 2014).

#### 2.3. Purificação de proteínas por cromatografia negativa

A cromatografia negativa envolve a recuperação da biomolécula alvo nas frações cromatográficas não retidas, enquanto outras proteínas e/ou impurezas são adsorvidas, podendo ser recuperadas nas etapas de eluição e regeneração. O emprego dessa

estratégia de cromatografia é especialmente relevante nas etapas iniciais e de polimento de um processo de recuperação e purificação de uma biomolécula. Quando utilizada nas etapas iniciais, a cromatografia negativa permite que muitos contaminantes possam ser removidos, diminuindo o número de operações nesse processo e, consequentemente, aumentando o rendimento da proteína de interesse. Nas etapas de polimento, essa estratégia pode ser utilizada para a eliminação de endotoxinas e fragmentos de DNA de células em que a biomolécula de interesse foi expressa (KARLSSON e HIRSH, 2011).

Um aspecto negativo do emprego da cromatografia negativa é a diluição da proteína de interesse, o que faz com que seja requerido uma etapa posterior de concentração dessa (KARLSSON e HIRSH, 2011). No entanto, essa técnica tem sido reportada como eficaz, nos processos de purificação de proteínas.

de Souza e colaboradores (2010) avaliaram a purificação de IgG a partir do plasma humano por cromatografia negativa em agarose com a diamina ω-aminohexil imobilizada. Nesse estudo, foi reportado a recuperação de 76% da IgG inicial com grau de pureza acima de 95%, em uma única etapa.

Caramelo-Nunes e colaboradores (2014) reportaram a recuperação de 87% do DNA plasmidial de *E. coli,* com pureza superior a 99% pela cromatografia negativa em agarose com o ligante 1,3-bis(4-fenilamidinio) triazeno.

A técnica de IMAC, quando utilizada como cromatografia negativa, é usualmente empregada nas etapas finais de um processo. Isso é decorrente da alta especificidade de IMAC o que dificulta a adsorção de uma elevada quantidade de impurezas (LEE *et al.,* 2014)

de Genaro e colaboradores (2002) avaliaram a recuperação e purificação da aprotinina a partir de efluente industrial empregando a cromatografia em quimotripsina imobilizada seguida da cromatografia negativa em agarose-IDA-Cu(II). Nesse estudo, foi reportado a recuperação da aprotinina com um fator de purificação superior a 952.

Bresolin e colaboradores (2012) relataram o emprego da cromatografia negativa na purificação de IgG adicionada artificialmente em extrato de soja, indicando a potencialidade desse método para a recuperação de proteínas recombinantes expressas em plantas. Nesse estudo, verificou-se que a cromatografia conduzida com o ligante TREN imobilizado em agarose, empregando o tampão MES, em pH 6,5 proporcionou a recuperação de 35,8% da IgG inicial, com pureza superior a 90%, nas frações não retidas na coluna.

Alguns trabalhos têm apresentado estratégias que possibilitam maior eficácia da cromatografia negativa e redução do número de operações em um processo de recuperação e purificação (LEE *et al.,* 2014). Um exemplo dessas estratégias é a técnica "Bead blot" a qual consiste em selecionar e imobilizar em um suporte cromatográfico diferentes ligantes, os quais apresentam afinidade pelas diversas impurezas presentes em um meio. Essa técnica foi estudada para remover do plasma humano o fibrinogênio, príons, o fator anti-hemofílico e o fator von Willebrand (LATHROP *et al.,* 2007).

Outra estratégia que possibilita maior eficácia da cromatografia negativa é o emprego do ligante fenil boronato. Esse ligante tem sido especialmente utilizado na purificação de DNA plasmidial, uma vez que possui afinidade por diferentes impurezas de um lisado celular, tais como lipopolissacarídeos e moléculas RNA. Gomes e colaboradores (2011) reportaram a potencialidade desse ligante na purificação de DNA plasmidial de *E. coli*, uma vez que houve adsorção de 75% das impurezas, enquanto o DNA plasmidial foi recuperado nas frações cromatográficas não retidas

Os trabalhos comentados anteriormente demonstram que os adsorventes caracterizados por proporcionar a recuperação da biomolécula alvo nas frações não retidas na coluna são eficientes na purificação. Embora a cromatografia negativa conduza à diluição da biomolécula alvo, em condições otimizadas a recuperação da proteína de interesse ocorre com elevada pureza.

72
# **CAPÍTULO 3: MATERIAIS E MÉTODOS**

# 3.1. Materiais

O gel de agarose (Sepharose-4B contendo 4% de agarose reticulada, tamanho de partícula entre 45-165 µm), ácido 2-[4-(2-hidroxietil) 1-piperazinil] - etanosulfônico (Hepes), papaína, imidazol, Tris(hidroximetil)-aminometano (Tris), poly(ethylene glycol) (PEG) de massa molar 6000 Da, agarose e o gel Sepharose – Proteína - A Fast Flow foram obtidos da Sigma-Aldrich (EUA). O ácido aspártico, ácido bromoacético, boroidreto de sódio, sulfato de cobalto, sulfato de níquel, sulfato de cobre, sulfato de zinco, etileno-dinitrilo-tetraacético sal dissódico (EDTA), isopropanol e a epicloridrina foram adquiridos da Merck (Alemanha). O fosfato de sódio monobásico anidro, fosfato de sódio bibásico anidro, ácido acético, ácido cítrico, ácido bórico, carbonato de sódio, metanol e etanol foram obtidos da Synth (Brasil). A acrilamida, bis-acrilamida e dodecil sulfato de sódio (SDS), N, N, N', N'- tetra-metilenodiamina (TEMED) foram obtidos da BioRad (EUA). O gel para focalização isoelétrica (Phast Gel pH 3-9) e o gel para exclusão molecular (Superdex 75, tamanho de partícula entre 45-165 µm e fracionamento de proteínas globulares de 3000 a 70000 kDa) foram adquiridos da GE Healthcare (EUA). O glicerol e ditiotrietol foram adquiridos da PlusOne (EUA). Azul de comassie brilhante G 250 foi obtido da Vetec (Brasil). Para a obtenção dos fragmentos foi utilizada a IgG humana obtida da CSL Behring (Alemanha). Para as análises de eletroforese SDS-PAGE foram utilizados como padrão a IgG humana obtido da CSL Behring (Alemanha) e o marcador de baixa massa molar contendo as seguintes proteínas: fosforilase b (97 kDa), albumina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa), a-lactalbumina (14,4 kDa), da GE Healthcare (EUA). Para a análise de Western Blotting foram empregados anticorpos de cabra anti-hIgG (Fab específico) e anticorpos de cabra anti-hIgG (Fc específico) conjugados a peroxidase, adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA), membrana de nitrocelulose de 0,2 mm Trans-Blot da Bio-Rad (EUA). O marcador de massa molar pré-corado contendo proteínas com as seguintes massas molares: 225 kDa (azul), 150 kDa (vermelho), 102 kDa (verde), 76 kDa (amarelo), 52 kDa (púrpura), 38 kDa (azul), 24 kDa (laranja), 17 kDa (azul), 12 kDa (vermelho) foi adquirido da GE Healthcare (EUA). Para o ensaio de imunodifusão radial foram empregados anticorpos de cabra anti-hIgG (Fab específico) conjugados a peroxidase da Sigma-Aldrich (EUA) e fragmento Fab de IgG humana com 99% de pureza da Merck (Alemanha). Os demais reagentes foram de grau analítico. Utilizou-se água ultrapura Milli-Q (Millipore, EUA) para preparação de todas as soluções e tampões.

#### 3.2. Métodos

# 3.2.1. Ativação do gel com epicloridrina

O gel de agarose foi ativado com epicloridrina conforme a metodologia descrita por Porath e Olin (1983). O gel embebido em água foi filtrado a vácuo. Posteriormente, 20 g de gel úmido foram colocados em um reator de vidro encamisado, o qual foi mantido em agitação (50 rpm) e a 25°C por banho termostático (Quimis, Brasil), durante toda a ativação. Em capela, foram adicionados ao gel, presente no reator, 5,0 mL de epicloridrina e 50,0 mL de NaOH (2,0 mol/L) contendo 0,266 g de boroidreto de sódio. Essa suspensão foi mantida em agitação por 15 min. Em seguida, gotejou-se simultaneamente, 50 mL de NaOH e 23,3 mL de epicloridrina, a uma vazão de 0,27 e 0,13 mL/min. Após esse procedimento, a suspensão permaneceu em agitação por 16 h. Subsequentemente, o gel foi lavado com água Mili-Q, até que o pH da água pós-lavagem fosse o mesmo da água de lavagem, indicando que o excesso de regentes foi removido.

### 3.2.2. Imobilização do ácido aspártico carboximetilado no gel ativado

A imobilização do ácido aspártico carboximetilado (CM-Asp) foi conduzida conforme a metodologia descrita por Mantovaara e colaboradores (1991), nas etapas de imobilização do ácido L-aspártico ao gel e na carboximetilação.

# 3.2.2.1 Imobilização do ácido L-aspártico:

O gel ativado com epicloridrina foi lavado com solução de carbonato de sódio (2,0 mol/L), com a finalidade de equilibrar o gel com a solução de carbonato, pH 11,5. Posteriormente 8,0 g de ácido L-aspártico, em solução de carbonato de sódio (1,0 mol/L), pH 11,5 foram adicionados ao gel. Essa suspensão foi mantida em agitação durante 24 h, a 25°C. Após a imobilização, o gel foi lavado com água Mili-Q, até que o pH da água pós-lavagem fosse o mesmo da água de lavagem.

# 3.2.2.2 Carboxi-metilação:

O gel com ácido L-aspártico imobilizado foi lavado com solução de carbonato de sódio (1,0 mol/L), pH 7,5. Em seguida, adicionou-se ao gel uma solução de hidróxido de sódio (4,0 mol/L) contendo 12,6 g de ácido bromoacético, em pH 10,5, ajustado por pastilhas de hidróxido de sódio. Essa suspensão foi mantida em agitação por 24 h, a 25°C. Após a imobilização, o gel foi lavado com água Mili-Q, até que o pH da água póslavagem fosse o mesmo da água de lavagem. Após a Carboxi-metilação, o gel obtido foi denominado agarose-CM-Asp.

# 3.2.3. Determinação da densidade de ligantes

A determinação da quantidade dos íons níquel, cobre, cobalto e zinco quelatado na matriz foi determinada alimentando a coluna cromatográfica (contendo 3,0 mL de gel) com solução de sulfato de níquel, cobre, cobalto e zinco (50 mmol/L) até a saturação. Em seguida o gel foi lavado com água, posteriormente com o tampão de eluição (Hepes 25 mmol/L, contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5). Posteriormente, o íon metálico do adsorvente foi removido com solução EDTA (ácido etileno-dinitrilo-

tetraacético) e coletado em frações. As frações foram agrupadas e analisadas por espectrômetria ótica de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP), empregando os comprimentos de onda de 231,604 nm para o níquel, 228,616 nm para o cobalto, 324,754 nm para o cobre e 213,856 nm para o zinco.

As análises de espectrômetria ótica foram realizadas pelo Centro Analítico de Instrumentação da Universidade de São Paulo, no equipamento Espectrômetro Ótico de Emissão Atômica com Plasma Indutivamente Acoplado (Spectro, Alemanha).

# 3.2.4. Obtenção dos fragmentos Fab e Fc de IgG humana policional

Os fragmentos Fab e Fc foram obtidos por meio da clivagem enzimática de IgG humana policional com papaína, de acordo com a metodologia descrita por Ternynck e Avrameas (1987). À solução de IgG (30 mg/mL), foram adicionados 850 µL de solução de L-cisteína (0,2 mol/L), 850 µL de solução de EDTA (0,04 mol/L), 300 µL de solução de papaína (1,0 mg/mL) e 230 µL de tampão fosfato (100 mmol/L), pH 7,4. Desse modo, a concentração final de IgG foi de 20 mg/mL, a L-cisteína e o EDTA adionados na razão de 1,0 mL / 20,0 mL de solução final e a papaína adicionada na razão de 1,0 mg de papaína/100,0 mg de IgG. Essa solução foi incubada a 37°C, por 2 h. Posteriormente, a clivagem enzimática foi interrompida, por meio da adição de solução de iodoacetamida (0,4 mol/L). Para o preparo das soluções de IgG, cisteína, papaína e iodoacetamida foi utilizado tampão fosfato (100 mmol/L), pH 7,4. Após 30 min, a solução foi submetida a cromatografia em coluna PD-10 contendo o gel Sephadex G-25 (GE Healthcare, EUA), para a troca de tampão. Em seguida, a solução foi fracionada em alíquotas, as quais foram estocadas em freezer a -20°C.

Para o desenvolvimento deste trabalho, foram realizadas várias bateladas para a obtenção dos fragmentos. Após todas, as soluções obtidas foram submetidas a ánalise de eletroforese SDS-PAGE.

#### 3.2.5. Experimentos cromatográficos

Os experimentos foram conduzidos em coluna cromatográfica C10/20 (GE Healthcare, EUA), empacotada com 3,0 mL de agarose-CM-Asp, acoplada a um cromatógrafo de fase líquida de baixa pressão (Äkta Prime Plus, GE Healthcare, EUA), a uma vazão de 0,5 mL/min (velocidade superdial de 38,2 cm/h) e a 25°C. Durante todo o experimento, a corrente de saída foi conectada a um monitor de medida de absorbância a 280 nm e dessa corrente foram coletadas frações de 1,0 mL. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

A coluna contendo o gel agarose-CM-Asp foi alimentada com 10 volumes de coluna (VC) de solução de sulfato de níquel, sulfato de cobalto, sulfato de cobre ou sulfato de zinco em água (50 mmol/L). Posteriormente, foi lavada com água ultrapura e com o tampão de eluição contendo a maior concentração de agente competidor (imidazol) pelo sítio do íon metálico, com a finalidade de remover o íon metálico fracamente quelatado ao CM-Asp.

Em seguida, a coluna contendo o gel agarose-CM-Asp com o metal quelatado foi equilibrada com o tampão de adsorção. Posteriormente, foi injetado 1,0 mL da solução contendo fragmentos obtidos pela clivagem da IgG. Finalizada a injeção, a coluna foi lavada com o tampão de adsorção, até que as proteínas não adsorvidas fossem eliminadas. Em seguida, as proteínas adsorvidas foram eluídas com o tampão de eluição. Concluída a eluição, a coluna foi regenerada com solução de EDTA a 100 mmol/L a pH 7,0. As condições cromatográficas utilizadas nas etapas de lavagem e eluição que foram testadas e que estão apresentadas neste trabalho estão esquematizadas na Tabela 3.1.

As frações obtidas foram quantificadas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) e aquelas situadas nos picos de proteína foram analisadas por eletroforese SDS-PAGE e *Western Blotting*.

77

Ligantes	Tampão de equilíbrio e adsorção	Tampão de eluição
CM-Asp-Ni(II) CM-Asp-Cu(II) CM-Asp-Co(II) - CM-Asp-Zn(II) p	Hepes Tris-HCl Fosfato de sódio Todos a 25 mmol/L, na ausência presença de NaCl (1,0 mol/L), pH 7,5	Adição de imidazol (100 mmol/L) ao tampão de e adsorção
CM-Asp-Co(II)	Hepes 25 mmol/L, pH 7,5	<ul> <li>Acetato 25 mmol/L, com diminuição do pH: 6,0; 5,0 e 4,0</li> <li>Aumento da concentração de imidazol: 20, 40, 60, 80 e 100 mmol/L</li> </ul>
CM-Asp-Cu(II)	Hepes 25 mmol/L, contendo imidazol (5 mmol/L) pH 7,5	Adição de imidazol (100 mmol/L) ao tampão de adsorção

**Tabela 3.1:** Condições experimentais empregadas nas cromatografias realizadas com os quelatos metálicos CM-Asp-Ni(II), CM-Asp-Co(II), CM-Asp-Cu(II) e CM-Asp-Zn(II).

# 3.2.6. Métodos analíticos

#### 3.2.6.1. Dosagem de proteínas totais

A concentração de proteína total nas frações coletadas durante os experimentos cromatográficos foi determinada por meio da metodologia de Bradford (1976), com albumina do soro bovino (BSA) como proteína de referência.

#### 3.2.6.2. Eletroforese SDS-PAGE

As frações com as maiores concentrações de proteína total, obtidas nas etapas de lavagem e eluição das cromatografias, foram analisadas por eletroforese SDS-PAGE. Essa técnica foi conduzida no equipamento Mini Protean III (BioRad, EUA), utilizando gel de poliacrilamida, na concentração de 10% (30% de acrilamida e 2,7% de bis-acrilamida), conforme a metodologia descrita por Laemmli (1970). Amostras das frações foram tratadas com tampões contendo SDS em condições desnaturantes e não-redutoras (sem a presença de β-mercaptoetanol) e desnaturadas por aquecimento a 100°C por 7 min. Alíquotas de 10 μL de cada amostra, de marcador de baixa massa

molecular e de marcador de IgG foram aplicadas aos géis. Esses foram submetidos à voltagem de 150 V em cuba vertical. A coloração dos géis foi realizada com nitrato de prata conforme a metodologia descrita por Morrissey (1981).

### 3.2.6.3. Western Blotting

O ensaio de *Western blot* envolve a transferência de moléculas de um gel de eletroforese para uma membrana, de modo que as proteínas adsorvidas na superfície da membrana são imunologicamente detectadas, por meio da adição de um antígeno conjugado a uma enzima e específico para determinado anticorpo (WESTERMEIER, 2011).

Neste trabalho, as frações com as maiores concentrações de proteína total, obtidas nas etapas de lavagem e eluição das cromatografias as quais apresentaram condições favoráveis para a purificação dos fragmentos Fab, foram analisadas pelo ensaios de *Western blot*. Esses ensaios foram realizados de acordo com a metodologia de Towbin *et al.* (1979), com a finalidade de detectar com especificidade os fragmentos Fab e Fc.

Inicialmente, foi realizada uma eletroforese, em que alíquotas de 10 µL de cada amostra e de marcador de massa molar pré-corado foram aplicadas a dois géis de poliacrilamida a 12%. Esses foram submetidos à voltagem de 100 V em cuba vertical. Após a eletroforese, as proteínas presentes nos géis foram transferidas para duas membranas de nitrocelulose em equipamento Mini Transblotting (Bio-Rad, EUA), aplicando-se voltagem constante de 100 V, por quarenta minutos. A eficiência da transferência foi verificada pela visualização do marcador pré-corado nas membranas.

Posteriormente, as membranas foram incubadas em tampão PBS (0,02 mol/L), contendo 5% leite em pó desnatado (Molico - Nestlé, Brasil) e Tween-20 (0,1%), com a finalidade de bloquear os sítios ligantes às proteínas, impedindo que os anticorpos adicionados se liguem de forma não-específica. Em seguida as membranas foram lavadas com a solução de lavagem (tampão PBS 0,02 mol/L contendo 0,1% de Tween-20). Subsequentemente, uma membrana foi incubada com o anticorpo de cabra anti-hlgG (Fab específico) e outra, com o anticorpo de cabra anti-hlgG (Fc específico)

conjugados a peroxidase. A reação foi revelada pela adição da mistura de substrato (0,003% de peróxido de hidrogênio) e cromógeno (diaminobenzidina 1,0 mg/mL) em tampão Tris-HCI (50 mmol/L), pH 7,4. A reação foi interrompida, após o aparecimento das bandas marcadas, por meio da lavagem das membranas com água ultrapura Milli-Q (Millipore, EUA).

As principais etapas conduzidas durante o ensaio de *Western blot* estão resumidas e esquematizadas na Figura 3.1.



**Figura 3.1:** Esquema das principais etapas realizadas durante o ensaio de *Western Blotting* (Fonte: Adaptado de WESTERMEIER, 2011).

# 3.2.6.4. Quantificação de fragmentos Fab por imunodifusão radial

O ensaio de imunodifusão radial apresenta como princípio a difusão de anticorpos em um gel acarretando a formação de complexos antígeno-anticorpo, os quais se precipitam formando um halo visível (MANCINI *et al.*, 1965).

A imunodifusão radial foi conduzida de acordo com a metodologia descrita por Lu e Miller (1996). Esse ensaio foi realizado com a finalidade de quantificar os fragmentos Fab, obtidos nas condições experimentais que possibilitaram a recuperação desses separados dos fragmentos Fc.

Para isso, inicialmente a injeção e as frações das etapas de lavagem, eluição e regeneração foram agrupadas em "pools". Posteriormente, foi preparado o gel de agarose a 2,1% em tampão Tris-HCI (90 mmol/L), ácido bórico (90 mmol/L) e EDTA (3 mmol/L) contendo 3% de polietilenoglicol (massa molar de 6000 Da), em banho a 90°C

até a dissolução completa da agarose. Em seguida, a solução foi resfriada até atingir  $55^{\circ}$ C e foi adicionado o antisoro, na proporção de 1,0  $\mu$ L para 1,0 mL de gel. O gel foi vertido em uma placa.

Após a gelificação do gel, foram realizados orifícios de 2 mm para a aplicação de 10  $\mu$ L da solução da injeção e dos "pools" de lavagem, eluição e regeneração e de amostras contendo concentrações conhecidas de Fab de alta pureza para a construção da curva padrão. Em seguida, o gel contendo as amostras foi incubado em câmara úmida a temperatura ambiente por 48 h. Subsequentemente, o gel foi lavado com tampão PBS por 24 h, com a finalidade de remover as proteínas não imunoprecipitadas e seco a 37°C por 24 h. O gel foi, então, corado com solução de etanol (45%), ácido acético (45%) contendo o corante Coomassie brilliant blue R-250 (0,5%) por 30 min. Em seguida o gel foi descorado por meio de repetitivas lavagens com solução etanol (30%), ácido acético (7%) e água (63%), até a vizualização dos halos de precipitação.

As principais etapas conduzidas durante o ensaio de imunodifusão radial estão resumidas e esquematizadas na Figura 3.2.

O diâmetro dos halos de precipitação foram medidos com paquímetro e convertidos em concentração de fragmentos Fab por meio da curva padrão determinada, a qual relaciona linearmente o diâmetro dos halos com o logarítimo da concentração de fragmentos Fab.





# 3.2.7. Determinação das curvas de ruptura de IgG

Foram realizados experimentos cromatográficos com os ligantes e condições cromatográficas que proporcionaram alta recuperação com um elevado fator de purificação, a obtenção dos fragmentos Fab separados da IgG e a obtenção seletiva desses na etapa de eluição. Desse modo, as curvas de ruptura foram determinadas para os ligantes e tampões de equilíbrio apresentados na Figura 3.3:

CM-Asp-Ni(II)	CM-Asp-Cu(II)	CM-Asp-Co(II)
<ul> <li>Hepes (25 mmol/L), na presença de NaCl (1,0 mol/L), pH 7,5</li> </ul>	<ul> <li>Fosfato de sódio (25 mmol/L), na presença de NaCl (1,0 mol/L), pH 7,5</li> </ul>	• Hepes (25 mmol/L), pH 7,5

Figura 3.3 Esquema dos ligantes e dos tampões de equilíbrio empregados na realização das curvas de ruptura

Esse experimento cromatográfico foi conduzido em duplicata e de modo similar ao descrito anteriormente, no item 3.2.4 Experimentos Cromatográficos. No entanto, posteriormente ao equilíbrio da coluna, alimentou-se essa com solução contendo fragmentos Fab, Fc e a IgG não clivada até que a concentração de proteína total na saída da coluna fosse similar à concentração de proteína total na solução de injeção (C/C<sub>o</sub>  $\approx$  1), indicando a saturação do adsorvente. Finalizada a alimentação da coluna, essa foi lavada com o tampão de adsorção. Posteriormente, as proteínas foram eluídas com o tampão de adsorção contendo imidazol (100 mmol/L). Em seguida, a coluna foi regenerada com EDTA (100 mmol/L), pH 7,0.

Durante o ensaio cromatográfico, com o ligante CM-Asp-Co(II) foram coletadas frações de 2,0 mL da corrente de saída das etapas de alimentação e lavagem da coluna e de 1,0 mL das etapas de eluição e regeneração. Para os ligantes CM-Asp-Ni(II) e CM-Asp-Cu(II) foram coletadas frações de 1,0 mL da corrente de saída na etapa de alimentação e de 5 ml das etapas de lavagem, eluição e regeneração

As frações obtidas foram monitoradas a 280 nm e quantificadas pelo método de Bradford (1976). A injeção e as frações cromatográficas das etapas de lavagem, eluição e regeneração foram agrupadas em "pools" e analisadas por eletroforese SDS-PAGE, Western blotting e imunodifusão radial.

# 3.2.8. Purificação sequencial dos fragmentos Fab e Fc para determinação do pl

# 3.2.8.1. Purificação em Sepharose - proteína A

Os fragmentos Fab e Fc foram purificados a partir de uma solução contendo Fab, Fc e IgG não clivada em gel Sepharose-proteína A com a finalidade de recupera-los com elevado grau de pureza para a determinação do ponto isoelétrico. Os experimentos foram conduzidos em coluna cromatográfica C10/20 (GE Healthcare, EUA) empacotada com 3,0 mL de gel proteina A Sepharose 4 Fast Flow (Amersham Biosciences, Suécia) acoplada a um cromatógrafo de fase líquida de baixa pressão (Akta, GE Healthcare, EUA), a uma vazão de 0,3 mL/min e a 25°C.

A coluna contendo o gel Sepharose-Proteína A foi equilibrada com tampão fosfato de sódio (100 mmol/L), pH 7,4. Posteriormente, foi injetado 1,0 mL da solução contendo os fragmentos e a IgG não clivada, com concentração de proteína total de 5,0 mg/mL, seguida da lavagem da coluna com o tampão de adsorção. A eluição foi conduzida com tampão glicina-HCI 100 mmol/L, pH 3,0. Em seguida, a coluna foi regenerada com tampão fosfato de sódio 100 mmol/L, pH 7,4.

Durante todo o experimento, a corrente de saída foi conectada a um monitor de medida de absorbância a 280 nm e dessa corrente foram coletadas frações de 1,0 mL. As frações de eluição coletadas em tubos Eppendorf contendo 100 µL de Tris-HCI (1,0 mol/L) pH 8,0, com a finalidade de neutralizar o pH, evitando a desnaturação das proteínas.

As frações coletadas nas etapas de lavagem e eluição foram agrupadas em "pools", concentradas por ultrafiltração em membrana de celulose de 10 kDa de diâmetro de corte (Millipore, EUA) até a obtenção de uma solução purificada de concentração proteica 1,0 mg/mL.

83

# 3.2.8.2. Purificação dos fragmentos Fab e Fc por cromatografia de exclusão molecular

As frações coletadas na eluição das cromatografias realizadas em gel de Sepharose-proteína A e no gel CM-Asp-Co(II), agrupadas em ""pool"s"e concentradas, foram submentidas a cromatografia de exclusão molecular em gel Superdex 75, com a finalidade de recuperá-los separados da IgG para a determinação do ponto isoelétrico.

Para isso, uma coluna cromatográfica C10/300 (Amersham Biosciences, Suécia) foi empacotada com 25 mL de gel Superdex 75 (GE Healthcare, EUA) acoplada a um cromatógrafo de fase líquida de baixa pressão (Akta, GE Healthcare), a uma vazão de 0,2 mL/min e a 25°C. A coluna foi equilibrada com tampão fosfato de sódio (100 mmol/L), pH 7,4. Posteriormente, foi injetado 200 μL da solução contendo os fragmentos e a IgG não clivada, com concentração de proteína total de 1,0 mg/mL, seguida da lavagem da coluna com o tampão de equilíbrio. Durante todo o experimento, da corrente de saída foi conectada a um monitor de medida de absorbância a 280 nm e dessa corrente foram coletadas frações de 0,5 mL.

As frações cromatográficas dos dois picos obtidos foram analisadas por eletroforese SDS-PAGE, revelando que um pico correspondia à IgG intacta enquanto o outro aos fragmentos Fab (quando foi injetada a eluição da cromatografia emI CM-Asp-Co(II)) e Fc (quando foi injetada a eluição da cromatografia em Sepharose - proteína A).

# 3.2.9. Eletroforese de focalização isoelétrica (Isoelectric focusing – IEF)

O Fab purificado em gel Sepharose-Proteína A, o Fc purificado em Sepharose-Proteína A seguido de permeação em gel e o Fab purificado por meio da cromatografia em gel CM-Asp-Co(II) seguida da permeação em gel foram caracterizados quanto ao ponto isoelétrico por meio da técnica de focalização isoelétrica.

A eletroforese do tipo IEF conduzida no equipamento PhastSystem (Pharmacia, Suécia) utilizando géis gradientes de pH 3 a 9 (GE Healthcare, EUA) e a coloração do gel foi conduzida com, segundo o protocolo descrito pelo fabricante.

# CAPÍTULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo, estão apresentados os resultados e a discussão referentes à avaliação do efeito dos tampões Hepes, Tris-HCI e fosfato e do cloreto de sódio na purificação de fragmentos Fab obtidos por meio da clivagem enzimática de IgG humana policional. Esse estudo foi realizado por meio da cromatografia empregando os quelatos CM-Asp-Ni(II), CM-Asp-Co(II), CM-Asp-Cu(II) e CM-Asp-Zn(II) imobilizados em gel agarose ativada com epicloridrina. Os efeitos do íon metálico, do tampão e do cloreto de sódio foram avaliados por meio da quantificação das proteínas recuperadas nas etapas de lavagem, eluição e regeneração e da seletividade averiguada pelos perfis eletroforéticos resultantes de cada condição experimental estudada. As condições que propiciaram a recuperação seletiva dos fragmentos Fab, evidenciadas pelos perfis eletroforéticos, foram analisadas pelo ensaio de Western blotting com a finalidade de confirmar, por meio de um imunoensaio, o perfil eletroforético. Para a condição cromatográfica em que houve a recuperação dos fragmentos Fab separados do Fc, realizou-se a quantificação de Fab por meio do ensaio de imunodifusão radial, determinando-se a pureza e o fator de purificação. Para as condições experimentais que possibilitaram a obtenção dos fragmentos com elevada recuperação e pureza (separados da IgG e dos fragmentos Fc) e na condição em que os fragmentos Fab foram recuperados na eluição foram determinadas as curvas de ruptura com a finalidade de se obter o ponto de ruptura e a capacidade dinâmica do adsorvente.

# 4.1. Efeito do íon metálico níquel na purificação de fragmentos Fab

A eficiência do quelato metálico CM-Asp-Ni(II) foi avaliada quanto a recuperação seletiva dos fragmentos Fab a partir de uma solução de IgG digerida (contendo fragmentos Fab, Fc e IgG não clivada), empregando os tampões de adsorção: Hepes, Tris-HCI e fosfato de sódio na concentração de 25 mmol/L, pH 7,5, com ou sem cloreto de sódio (1,0 mol/L). Com tal finalidade, determinou-se a porcentagem de proteínas

totais adsorvidas e não adsorvidas na coluna por meio do método de Bradford, e qualitativamente, a pureza dos fragmentos Fab por meio do perfil eletroforético e do ensaio de *Western blotting*.

As Figuras 4.1 e 4.2 demonstram as porcentagens de proteínas totais adsorvidas e os perfis eletroforéticos, respectivamente, dos ensaios cromatográficos. Os cromatogramas, eletroforeses, em duplicata, e balanços de massas dessas condições estão apresentados no Apêndice B.



**Figura 4.1:** Porcentagem de proteínas totais adsorvidas e não adsorvidas das cromatografias realizadas no quelato metálico CM-Asp-Ni(II) empregando os tampões de adsorção Hepes, Tris-HCI e fosfato de sódio na ausência e presença de cloreto sódio. Quantidade de níquel imobilizado: 7,50 µmol Ni(II)/mL de gel.

Observou-se que a adição de cloreto de sódio nos tampões de adsorção Hepes e Tris-HCl favoreceu o aumento na quantidade de proteína total recuperada nas etapas de lavagem (Figura 4.1). Além disso, a presença de sal possibilitou a recuperação dos fragmentos Fab nas frações de lavagem seletivamente, conforme indicado no perfil eletroforético (Figura 4.2).

As frações cromatográficas das condições que proporcionaram a recuperação dos fragmentos Fab separados do Fc foram analisadas por meio do ensaio de *Western blot* (Figura 4.3), com a finalidade de confirmar, por meio da detecção imunológica os fragmentos Fab e Fc.



**Figura 4.2:** Perfil eletroforético das frações cromatográficas dos experimentos em agarose-CM-Asp-Ni(II) utilizando os sistemas tamponantes Hepes, Tris-HCI e fosfato de sódio pH 7,5, na ausência e presença de cloreto de sódio. M – marcador de baixa massa molecular; IgG – marcador de IgG; A – solução de injeção; L - fração de lavagem; E - fração de eluição.

O Western blot confirmou a recuperação dos fragmentos Fab separados do Fc nas frações de lavagem (Figura 4.3) nas cromatografias conduzidas empregando os tampões Hepes e fosfato de sódio na presença de NaCl. No entanto, na cromatografia utilizando o tampão de adsorção Tris com NaCl, foi detectado a presença de fragmentos Fc nas frações de lavagem (Figura 4.3).



**Figura 4.3:** Perfil do *Western blot* das frações das cromatografias em agarose-CM-Asp-Ni(II) utilizando os sistemas tamponantes Hepes, Tris-HCI e fosfato de sódio pH 7,5, na presença de cloreto de sódio. Mc – marcador de massa molar pré-corado; L - frações de lavagem; E - frações de eluição.

As frações cromatográficas das condições tamponantes que proporcionaram a recuperação seletiva dos fragmentos Fab, foram submetidas a anáilise de RID para a determinação da pureza e do fator de purificação (Tabela 4.1). Nas cromatografias conduzidas com CM-Asp-Ni(II) com o tampão Hepes na presença de NaCI (1,0 mol/L)

os fragmentos Fab foram recuperados com valor calculado de pureza de 101% e nas cromatografias conduzidas com o tampão fosfato de sódio na presença de NaCl (1,0 mol/L) os fragmentos Fab foram recuperados com 94% de pureza.

**Tabela 4.1:** Balanço de massa da cromatografia em agarose-CM-Asp-Ni(II) em tampão de equilíbrio e lavagem Hepes e fosfato de sódio, na presença de NaCI, pH 7,5; eluição: Hepes, na presença de NaCI contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5 e regeneração: EDTA 100 mmol/L, pH 7,0.

	Bradford				RID			
	Fração	Massa (mg) <sup>a</sup>	% <sup>b</sup>	Massa (mg) <sup>c</sup>	% <sup>d</sup>	Pureza (%) <sup>e</sup>	$FP^{f}$	
	Injeção	5,22 ± 0,07	100	$3,5 \pm 0,4$	100,0	63 ± 2	1,0	
L COM	"pool" Lavagem	$3,38 \pm 0,36$	59,7	$3,6 \pm 0,4$	104,8	101 ± 6	1,6	
les ( VaC	"pool" Eluição	1,92 ± 0,01	36,8	0,3 ± 0,1	9,4	17 ± 4	0,2	
Hep	"pool" Regeneração	0,00	0,0					
	Recuperação (%)	101,5 ± 5	5,4		112,8	± 2,7		
dio	Injeção	5,11 ± 0,0'8	100	$2,9 \pm 0,2$	100,0	58 ± 5		
e só aCI	"pool" Lavagem	$3,48 \pm 0,05$	68,1	$3,2 \pm 0,2$	107,0	94 ± 5	1,6	
sfato de com Na	"pool" Eluição	1,32 ± 0,02	25,9	$0,2 \pm 0,0$	6,8	15 ± 0	0,2	
	"pool" regeneração	0,00	0					
РО Ц	Recuperação (%)	94,0 ± 1	,2		114,9	± 9,9		

<sup>a</sup> Massa de proteína total estimada pelo método de Bradford (1976), com IgG humana como proteína de referência

<sup>b</sup> Massa de proteína total em cada etapa dividida pela massa de proteína na injeção x 100

<sup>c</sup> Massa de fragmentos Fab e de IgG estimada por RID

<sup>d</sup> Massa de fragmentos Fab e de IgG em cada etapa dividida pela massa de fragmentos Fab e de IgG na injeção x 100

<sup>e</sup> Pureza: massa de fragmentos Fab e de IgG dividida pela massa de proteína total de cada etapa multiplicada por 100

<sup>†</sup>Fator de purificação: pureza dividida pela pureza da solução de injeção

Os resultados das cromatografias realizadas em agarose-CM-Asp-Ni(II) revelaram a adsorção dos fragmentos Fc e de IgG não clivada. Tal comportamento pode ser atribuído às ligações de coordenação entre o metal quelatado Ni(II) e grupos doadores de elétrons acessíveis presentes na estrutura dessas proteínas. De fato, no valor de pH em que os experimentos foram conduzidos (pH 7,5), o nitrogênio do imidazol da histidina se encontra na forma desprotonada (pKa ~6,5).

Hale e Beidler (1994) demonstraram a presença de uma região rica em histidina

no domínio CH3 de IgG<sub>1</sub> de murinos. Mais tarde, Todorova-Balvay e colaboradores (2004), por meio de cálculos computacionais, revelaram a presença do *cluster* de histidina, His 433-X-His 435 acessível, no fragmento Fc de IgG humana policional. Portanto, é possível inferir que as ligações de coordenação entre o metal quelatado e o nitrogênio do imidazol da histidina dos fragmentos Fc contribuíram para a adsorção desses e da IgG não clivada nos quelatos metálicos. Essa afirmação é reiterada pelo fato de os experimentos conduzidos na presença de elevadas concentrações de cloreto de sódio favorecerem a adsorção dessas moléculas. No entanto, nos experimentos realizados na ausência de sal, interações de caráter eletrostático podem ter contribuído para a adsorção dos fragmentos Fc aos quelatos. A adsorção do fragmento Fab pode estar relacionada às possíveis interações eletrostáticas entre essa biomolécula e o ligante.

Os resultados indicam a dependência da quantidade de proteína adsorvida e não adsorvida e do grau pureza com o sistema tamponante utilizado. Na Figura 4.4 são apresentadas as estruturas dos tampões utilizados.





O tampão Hepes apresenta pKa de 7,48 a 25°C (SIGMA ALDRICH, 2013). Portanto, no valor de pH em que os experimentos foram conduzidos, praticamente 50% das moléculas estão com duas cargas de sinais opostos e 50% com carga líquida negativa (Figura 4.4). O tampão fosfato possui três pKas iguais a 2,12 e 7,20 e 12,67 (MOHAN, 2003). Esse tampão apresenta oxigênio desprotonado capaz de competir fracamente pelo sítio de adsorção de proteínas em IMAC (CHOTTARD *et al.,* 1992). O tampão Tris-HCI é caracterizado por apresentar uma faixa tamponante de 7,0 a 9,0 e possuir um pKa de 8,3, portanto, abaixo desse valor de pH, o Tris se encontra com carga líquida positiva. Além disso, esse tampão possui em sua estrutura um grupamento amino, o qual apresenta um par de elétrons disponível que pode participar da ligação de coordenação com o metal quelatado (SERPA, 2002). Tal característica estrutural acarreta a competição do tampão pelo íon metálico, com a proteína. Alguns trabalhos têm relatado um aumento da seletividade na purificação de IgG a partir do plasma humano devido ao caráter competitivo do tampão Tris, na ausência de sal (SERPA *et al.,* 2005; RIBEIRO *et al.,* 2008; BRESOLIN *et al.,* 2010; MING, 2011).

Comparando os resultados entre as cromatografias realizadas com os tampões na ausência de sal, observa-se que a quantidade de proteína adsorvida (Figura 4.1) diminui com o aumento da força iônica dos tampões (Tabela 4.2). Tal comportamento pode estar relacionado ao enfraquecimento das interações não específicas entre as proteínas e o quelato metálico.

Tampão	Força iônica (mol/L)
Hepes	0,011
Tris-HCI	0,022
Fosfato de sódio	0,066

Tabela 4.2 : Força iônica dos tampões Hepes, Tris-HCl e fosfato de sódio (25 mmol/L), pH 7,5.

*Força iônica* =  $1/2 \sum c_i z_i^2$ , em que  $c_i$  e  $z_i$  são a concentração e carga de cada íon, respectivamente.

Além disso, observa-se que, na ausência de sal, a quantidade de proteína adsorvida (Figura 4.1) é menor ao se empregar os tampões Tris-HCl e fosfato de sódio em relação ao Hepes. Esse fato pode estar relacionado à presença de grupamentos químicos nos tampões fosfato e Tris-HCl capazes de competir com a proteína pelo sítio de adsorção.

Os resultados das cromatografias conduzidas com o tampão Tris-HCI na presença de NaCI indicam que os fragmentos Fab não foram recuperados separados do Fc. Esse resultado pode estar relacionado às interações entre o grupamento amino do Tris-HCI com o íon metálico quelatado dificultando a adsorção do fragmento Fc e consequentemente a sua não retenção.

Em condições cromatográficas em que a força iônica do tampão de adsorção é

baixa, o quelato se comporta como um trocador de íons possibilitando a adsorção de proteínas por interações não específicas (GABERC-POREKAR e MENART, 2001; UEDA *et al.*, 2003). Com o aumento da força iônica do tampão de adsorção, as interações entre o íon metálico e moléculas de água são enfraquecidas, favorecendo a adsorção das proteínas (UEDA *et al.*, 2003; PRASANA e VIJAYALAKSHMI, 2010). Segundo Porath e colaboradores 1975, em elevadas concentrações de sal (geralmente 1,0 mol/L de NaCI) associadas a valores de pH em que os resíduos de histidina estejam desprotonados, interações não específicas, tais como as eletrostáticas, entre os quelatos metálicos e os aminoácidos na superfície da proteína, assim como, entre proteínas são minimizadas.

# 4.1.1. Determinação do ponto de ruptura da agarose-CM-Asp-Ni(II)

Foram realizados experimentos para determinação da curva de ruptura do adsorvente agarose-CM-Asp-Ni(II) com Hepes como tampão de adsorção com a finalidade de determinar o ponto de ruptura e a seletividade do adsorvente. Essa condição cromatográfica foi selecionada por ter proporcionado a maior recuperação e grau de pureza (100%) dos fragmentos Fab nas frações não retidas, separado dos fragmentos Fc. A curva de ruptura e o perfil do *Western blot* estão representados na Figura 4.5 e Figura 4.6. A duplicata do cromatograma e balanços de massas dessas condições estão apresentados no Apêndice B.

Segundo o ensaio de *Western blot* (Figura 4.6), os fragmentos Fab são recuperados separados do Fc nas frações de 7 a 17, porém contendo a IgG intacta. Como houve purificação dos fragmentos Fab, determinou-se sua pureza e o fator de purificação por RID. As análises foram realizadas agrupando-se as frações cromatográficas de 1 a 17 ("pool" Fab), as frações das etapas de lavagem ("pool" lavagem) e as frações da etapa de eluição ("pool" eluição). Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 4.3.

92



**Figura 4.5:** a) Início da curva de ruptura no gel agarose-CM-Asp-Ni(II) em tampão Hepes, com NaCI (1,0 mol/L), em pH 7,5. Leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/mim. I: Injeção de 33,0 mL de solução de digestão (Fab e Fc de IgG humana) na concentração de 0,97 mg/mL (concentração de proteína total estimada pelo método de Bradford, com BSA como proteína de referência). b) L: Lavagem tampãoHepes, com NaCI (1,0 mol/L), pH 7,5. E: Eluição tampão Hepes, com NaCI (1,0 mol/L), contendo 100,0 mmol/L de imidazol, pH 7,5. R: Regeneração com EDTA 100 mmol/L, pH 7,0.

Os resultados obtidos pelo ensaio RID confirmam o perfil eletroforético e o *Western blot*, indicando que 13,1% os fragmentos Fab são recuperados com elevada pureza nas frações de não retidas na coluna (valor calculado de pureza de 106%), porém contendo IgG não clivada. Além disso, a capacidade dinâmica de adsorção do adsorvente agarose-CM-Asp-Ni(II) foi de 1,50 mg/mL de gel. Os valores de pureza para os fragmentos Fab, foram superiores a 100%. Esse resultado pode ser explicado pelas diferenças nos métodos de quantificação. A quantificação de proteínas totais foi realizada pelo método de Bradford (1976), o qual pode apresentar uma variação dependendo da proteína dosada, subestimando a concentração de Fab. No entanto, a imunodifusão radial, por ser um ensaio baseado na interação antígeno-anticorpo, é mais específica que o método de Bradford.



**Figura 4.6:** Perfil do *Western blot* das frações cromatográficas das cromatografias em agarose-CM-Asp-Ni(II) em sistema tamponante Hepes, com NaCl (1 mol/L), pH 7,5. Eluição com tampão Hepes, com NaCl (1 mol/L), contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5. Regeneração com EDTA 100 mmol/L, pH 7,0. Mc – Marcador de massa molecular pré-corado; Inj – solução da injeção; L – "pool" da lavagem; E – "pool" da eluição. (a) membrana em que houve adição de anti-Fab; (b) membrana em que houve adição de anti-Fc.

Tabela 4.3: Balanço de massa da curva de ruptura em agarose-CM-Asp-Ni(II) em tampão de equilíbrio e lavagem Hepes, NaCl (1,0 mol/L), pH 7,5; eluição: Hepes, na presença de NaCl (1,0 mol/L) contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5 e regeneração: EDTA 100 mmol/L, pH 7,0.

	Bra	dford		RID			
Fração	Massa (mg) <sup>a</sup>	% <sup>b</sup>	Massa (mg) <sup>c</sup>	% <sup>d</sup>	Pureza (%) <sup>e</sup>	$FP^{f}$	
Injeção	40,36 ± 0,14	100,0	26,1 ± 0,0	100,0	65 ± 0	1,0	
"pool" Fab	$3,24 \pm 0,10$	8,0	$3,4 \pm 0,2$	13,1	106 ± 3	1,6	
"pool" Lavagem	$37,94 \pm 0,79$	94,0	27,1 ± 1,1	103,8	71 ± 2	1,1	
"pool" Eluição	$4,49 \pm 0,01$	11,1	$0,6 \pm 0,0$	2,2	13 ± 0	0,2	
"pool" Regeneração	0,00	0,0					
Recuperação (%)	105,1 ±	£ 1,7		106,0	± 4,2		

<sup>a</sup> Massa de proteína total estimada pelo método de Bradford (1976), com IgG como proteína de referência

<sup>b</sup> Massa de proteína total em cada etapa dividida pela massa de proteína na injeção x 100 <sup>c</sup> Massa de fragmentos Fab e de IgG estimada por RID

<sup>d</sup> Massa de fragmentos Fab e de IgG em cada etapa dividida pela massa de fragmentos Fab e de IgG na injeção x 100

<sup>e</sup> Pureza: massa de fragmentos Fab e de IgG dividida pela massa de proteína total de cada etapa multiplicada por 100

<sup>f</sup> Fator de purificação: pureza dividida pela pureza da solução de injeção.

# 4.2. Efeito do íon metálico cobre na purificação de fragmentos Fab

O íon metálico cobre foi avaliado na purificação de fragmentos Fab com a finalidade de se obter os fragmentos Fab separados do Fc e da IgG intacta. De acordo com Sulkowski (1989), o íon metálico cobre guelatado ao IDA reguer pelo menos um resíduo de histidina disponível para a ligação de coordenação com uma proteína. Assim, espera-se que os fragmentos Fc e da IgG intacta sejam adsorvidos ao quelato metálico, enquanto os fragmentos Fab sejam recuperados nas frações não retidas na coluna.

As Figuras 4.7 e 4.8 retratam as porcentagens de proteínas totais adsorvidas e não adsorvidas е OS perfis eletroforéticos. respectivamente, dos ensaios cromatográficos. Os cromatogramas, eletroforeses, em duplicata, e balanços de massas das cromatografias conduzidas com os tampões Hepes, Tris-HCI e fosfato de sódio na ausência e presença de NaCI (1,0 mol/L) estão apresentados no Apêndice C.

Observou-se que a presença de cloreto de sódio no tampão de adsorção

favoreceu o aumento na quantidade de proteínas totais recuperadas nas etapas de lavagem (Figura 4.7). Além disso, a presença de sal possibilitou a recuperação dos fragmentos Fab nas frações de lavagem seletivamente, conforme indicado no perfil eletroforético (Figura 4.8).



**Figura 4.7:** Porcentagem de proteínas totais adsorvidas e não adsorvidas das cromatografias realizadas no quelato metálico CM-Asp-Cu(II) empregando os tampões de adsorção Hepes, Tris-HCI e fosfato de sódio na ausência e presença de cloreto sódio. Quantidade de cobre: 7,80 µmol Cu(II)/mL de gel.

As frações cromatográficas das condições tamponantes que proporcionaram a recuperação dos fragmentos Fab separados do Fc foram analisadas por meio do ensaio de *Western blot* (Figura 4.9), com a finalidade de confirmar, por meio da detecção imunológica os fragmentos Fab e Fc. As frações cromatográficas das condições tamponantes que proporcionaram a recuperação seletiva dos fragmentos Fab, foram submetidas a anáilise de RID para a determinação da pureza e do fator de purificação (Tabela 4.4).

Nas cromatografias com CM-Asp-Cu(II), na ausência de NaCI no tampão de equilíbrio, houve a adsorção de praticamente todas as proteínas. Esse comportamento pode ser explicado pelo fato de, em baixa força iônica, o quelato metálico se comportar como um trocador de íons possibilitando a adsorção de proteínas por interações não específicas (GABERC-POREKAR e MENART, 2001; UEDA *et al.*, 2003).



**Figura 4.8:** Perfil eletroforético das frações cromatográficas dos experimentos em agarose-CM-Asp-Cu(II) utilizando os sistemas tamponantes Hepes, Tris-HCI e fosfato de sódio pH 7,5, na ausência e presença de cloreto de sódio. M – marcador de baixa massa molecular; IgG – marcador de IgG; A – solução de injeção. L - fração de lavagem; E - fração de eluição.

Nas cromatografias com CM-Asp-Cu(II), na presença de NaCI, houve a adsorção dos fragmentos Fab (Figura 4.8 e Figura 4.9). Tal comportamento pode ser explicado pelo fato dos fragmentos Fab apresentarem o aminoácido histidina na sua sequência primária (TODOROVA-BALVAY *et al.*, 2004). Segundo Sulkowski (1989), o metal cobre quelatado ao IDA, requer pelo menos um resíduo de histidina disponível para a ligação de coordenação com a proteína, ao se empregar tampões com NaCI. Porém, os ions metálicos Ni(II), Co(II) e Zn(II), requerem mais resíduos de histidina e/ou

que esses se apresentem em determinadas conformações estruturais para ocorrer a ligaçoes de coordenação. Portanto, é possível que os resíduos de histidina do fragmento Fab estejam disponíveis para a adsorção por coordenação com o CM-Asp-Cu(II).



**Figura 4.9:** Perfil do *Western blot* das frações das cromatografias em agarose-CM-Asp-Cu(II) utilizando os sistemas tamponantes Hepes, Tris-HCI e fosfato de sódio pH 7,5, na presença de cloreto de sódio. Mc – marcador de massa molar pré-corado; L - frações de lavagem; E - frações de eluição.

**Tabela 4.4.** Balanço de massa da cromatografia em agarose-CM-Asp-Cu(II) com tampão de equilíbrio e lavagem Tris-HCI e fosfato de sódio na presença de NaCI; eluição: Tris-HCI 25 na presença de NaCI contendo 100,0 mmol/L de imidazol, pH 7,5. pH 7,5 e regeneração: EDTA 100 mmol/L, pH 7,0.

	E	Bradford					
	Fração	Massa (mg) <sup>a</sup>	% <sup>b</sup>	Massa (mg) <sup>c</sup>	% <sup>d</sup>	Pureza (%) <sup>e</sup>	FP <sup>f</sup>
aCl	Injeção	5,22 ± 0,01	100	3,0 ± 0,1	100	57 <u>+</u> 1	1,0
Z E	"pool" Lavagem	1,47 <u>+</u> 0,06	28,2	1,3 ± 0,0	4,0	90 ± 5	1,6
CO	"pool" Eluição	3,84 <u>+</u> 0,22	73,6	$2,2\pm0,0$	73,0	57 <u>+</u> 4	1,0
-HC	"pool" Regeneração	$0,00\pm0,00$	0,0				
Tris	Recuperação (%)	101,8 <u>+</u> 5	,5		118,0	± 1,5	
dio	Injeção	5,88 ± 0,31	100	$3,2\pm0,0$	100	55 <u>+</u> 3	1,0
e sóc aCI	"pool" Lavagem	1,42 <u>+</u> 0,03	24,2	1,3 ± 0,0	41,0	94 <u>+</u> 3	1,7
sfato de com Na	"pool" Eluição	4,69 ± 0,11	79,8	1,8 ± 0,0	6,8	39 <u>+</u> 1	0,7
	"pool" Regeneração	0,00	0,0				
Бo	Recuperação (%)	104,2 <u>+</u>	5,6		97,	5 ± 0,8	

<sup>a</sup> Massa de proteína total estimada pelo método de Bradford (1976), com IgG humana como proteína de referência

<sup>b</sup> Massa de proteína total em cada etapa dividida pela massa de proteína na injeção x 100

<sup>c</sup> Massa de fragmentos Fab e de IgG estimada por RID

<sup>d</sup> Massa de fragmentos Fab e de IgG em cada etapa dividida pela massa de fragmentos Fab e de IgG na injeção x 100

<sup>e</sup> Pureza: massa de fragmentos Fab e de IgG dividida pela massa de proteína total de cada etapa multiplicada por 100

<sup>†</sup>Fator de purificação: pureza dividida pela pureza da solução de injeção

A recuperação seletiva dos fragmentos Fab, assim como, a adsorção de proteina total ao ligante CM-Asp-Cu(II) é dependente do sistema tamponante empregado. O emprego do tampão de carga líquida positiva Tris-HCI e o tampão de carga líquida negativa, fosfato de sódio na presença de cloreto de sódio, possibilitaram a obtenção de 43% e 41%, respectivamente, dos fragmentos Fab separados do Fc nas frações de lavagem. Uma possível explicação para tais resultados pode estar relacionada ao enfraquecimento das ligações não específicas entre as proteínas e o quelato metálico. A adição de sal ao tampão de adsorção suprime as interações entre o íon metálico e moléculas de água, favorecendo a adsorção das proteínas, aumentando a seletividade e a estabilidade do complexo formado entre proteína e quelato metálico

(UEDA *et al.,* 2003; TODOROVA e VIJAYALAKSHMI, 2006; PRASANA e VIJAYALAKSHMI, 2010).

Com a finalidade de recuperar com seletividade os fragmentos Fab, na cromatografia conduzida com o quelato CM-Asp-Cu(II) e tampão Hepes, empregou-se a estratégia de adicionar ao tampão de adsorção 5 mmol/L de imidazol (Figura 4.10).



**Figura 4.10:** Perfil eletroforético (a) e *Western blot* (b) das frações das cromatografias em agarose-CM-Asp-Cu(II). Tampão de adsorção: Hepes com 5 mmol/L imidazol pH 7,5. Eluição: Hepes com 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5. M – marcador de baixa massa molecular; IgG – marcador de IgG; A – solução de injeção. Mc – marcador de massa molar pré-corado; L-frações de lavagem; E - frações de eluição.

Na cromatografia com adição de 5 mmol/L de imidazol ao tampão de adsorção, os fragmentos Fab não foram obtidos seletivamente. Esse resultado pode estar relacionado ao fato de o nitrogênio do imidazol se ligar ao metal quelatado impedindo a ligação dos fragmentos Fc e consequentemente sua recuperação nas frações não retidas na coluna.

# 4.2.1. Determinação do ponto de ruptura do adsorvente agarose-CM-Asp-Cu(II)

Foram realizados experimentos para determinação da curva de ruptura no adsorvente agarose-CM-Asp-Cu(II) em tampão fosfato de sódio com NaCI (1,0 mol/L) como tampão de adsorção e fosfato de sódio com NaCI (1,0 mol/L) contendo imidazol como tampão de eluição com a finalidade de determinar o ponto de ruptura e a seletividade do adsorvente. Essa condição cromatográfica foi selecionada por ter proporcionado a maior recuperação com maior grau de pureza dos fragmentos Fab (recuperação de 41,05% de fragmento Fab com pureza de 94%) nas frações de lavagem, separado dos fragmentos Fc. A curva de ruptura e o perfil do *Western blot* estão representados nas Figuras 4.11 e 4.12. A duplicata da cromatografia e os balanços de massas da curva de ruptura estão apresentados no Apêndice C.

Segundo o *Western blot* (Figura 4.12), os fragmentos Fab foram recuperados separados do Fc nas frações de 9 a 31. Como houve purificação dos fragmentos Fab, determinou-se sua pureza e o fator de purificação por RID. As análises foram realizadas agrupando-se as frações cromatográficas de 1 a 31 ("pool" Fab), as frações das etapas de lavagem ("pool" lavagem) e as frações da etapa de eluição ("pool" eluição). Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 4.5.

Os resultados obtidos por RID confirmam o perfil eletroforético e o *Western blot*, indicando que os fragmentos Fab são recuperados com elevada pureza nas frações não retidas (106% de pureza).

101



**Figura 4.11:** (a) Curva de ruptura no gel agarose-CM-Asp-Cu(II) utilizando sistema tamponante fosfato de sódio, com NaCl (1,0 mol/L), em pH 7,5. Leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. I: Injeção de 89,0 mL de solução de IgG digerida na concentração de 0,99 mg /mL (concentração de proteína total estimada pelo método de Bradford, com BSA como proteína de referência). (b) L: Lavagem com tampão fosfato de sódio 25 mmol/L, na presença de NaCl , pH 7,5. E: Eluição com tampão fosfato de sódio, na presença de NaCl, contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5. R: Regeneração com EDTA 100 mmol/L, pH 7,0.

**Tabela 4.5:** Balanço de massa por RID da curva de ruptura em agarose-CM-Asp-Cu(II) em tampão de equilíbrio e lavagem fosfato de sódio, NaCl (1,0 mol/L), pH 7,5; eluição: fosfato de sódio, na presença de NaCl (1,0 mol/L) contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5 e regeneração: EDTA 100 mmol/L, pH 7,0.

	В	radford		RID			
Fração	Massa (mg) <sup>a</sup>	% <sup>b</sup>	Massa (mg) <sup>c</sup>	% <sup>d</sup>	Pureza (%) <sup>e</sup>	FP <sup>f</sup>	
Injeção	110,27 ± 3,12	100	63,4 ± 5	100	57 ± 4	1,0	
"pool" Fab	8,13 ± 0,05	7,4	8,6 ± 0,5	13,6	106 ± 6	1,9	
"pool" Lavagem	$70,78\pm0,77$	64,2	43,1 ± 2,9	68,1	61 ± 4	1,1	
"pool" Eluição	36,11 ± 0,41	32,8	$19,5\pm0,8$	30,8	54 ± 2	0,9	
"pool" Regeneração	0,00						
Recuperação (%)	97	.0 + 3.0	0		99.1 + 4.0		

<sup>a</sup> Massa de proteína total estimada pelo método de Bradford (1976), com IgG humana como proteína de referência

<sup>b</sup> Massa de proteína total em cada etapa dividida pela massa de proteína na injeção x 100

<sup>c</sup> Massa de fragmentos Fab e de IgG estimada por RID

<sup>d</sup> Massa de fragmentos Fab e de IgG em cada etapa dividida pela massa de fragmentos Fab e de IgG na injeção x 100

<sup>e</sup> Pureza: massa de fragmentos Fab e de IgG dividida pela massa de proteína total de cada etapa multiplicada por 100

<sup>†</sup>Fator de purificação: pureza dividida pela pureza da solução de injeção



**Figura 4.12:** Perfil do *Western blot* das frações da cromatografia em agarose-CM-Asp-Cu(II) em sistema tamponante fosfato de sódio, com NaCl (1 mol/L) em pH 7,5. Eluição com tampão de sódio, com NaCl (1 mol/L) contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5. Regeneração com EDTA 100 mmol/L, pH 7,0. Membrana de nitrocelulose: Mc – Marcador de massa molecular pré-corado; Inj – solução da injeção; L – "pool" da lavagem; E – "pool" da eluição. (a ) membrana em que houve adição de anti-Fab; (b) membrana em que houve adição de anti-Fc.

# 4.3. Efeito do íon metálico cobalto na purificação de fragmentos Fab

De acordo com Sulkowski (1989), o íon metálico cobalto quelatado ao IDA requer a presença de dois resíduos de histidinas, situadas em uma α-hélice e entre dois ou três aminoácidos, disponíveis para a ligação de coordenação com uma proteína. No estudo de Todorova-Balvay *et al.* (2004), foi demonstrado que os fragmentos Fc apresentam um presença do cluster de histidina, His 433-X-His 435 acessível no fragmento Fc de IgG humana policional. Baseando-se nesses estudos, espera-se uma adsorção seletiva dos fragmentos Fc e da IgG intacta ao quelato metálico, enquanto maior quantidade de fragmentos Fab seja recuperada nas frações não retidas na coluna, quando comparado com os quelatos metálicos CM-Asp-Ni(II) e CM-Asp-Cu(II).

As Figuras 4.13 e 4.14 retratam as porcentagens de proteínas totais adsorvidas e não adsorvidas e os perfis eletroforéticos, respectivamente, dos ensaios cromatográficos. Os cromatogramas, eletroforeses (em duplicata) e balanços de massas das cromatografias conduzidas com os tampões Hepes, Tris-HCI e fosfato de sódio, na ausência e presença de NaCI estão apresentados no Apêndice D.



**Figura 4.13:** Porcentagem de proteínas totais adsorvidas e não adsorvidas das cromatografias realizadas no quelato metálico CM-Asp-Co(II) empregando os tampões de adsorção Hepes, Tris-HCI e fosfato de sódio na ausência e presença de cloreto sódio. Quantidade de íon metálico imobilizado: 7,44 µmol Co(II)/mL de gel



**Figura 4.14:** Perfil eletroforético das frações das cromatografias em agarose-CM-Asp-Co(II) utilizando os sistemas tamponantes Hepes (a) e Tris-HCI (b) ambos em pH 7,5, na ausência de cloreto de sódio. M – marcador de baixa massa molecular; IgG – marcador de IgG; A – solução de injeção. L - frações de lavagem; E - frações de eluição.



**Figura 4.15:** Perfil do *Western blot* das frações das cromatografias em agarose-CM-Asp-Co(II) utilizando os sistemas tamponantes Hepes (a) e Tris-HCI (b) ambos em pH 7,5, na ausência de cloreto de sódio. Mc – marcador de massa molar pré-corado; L - frações de lavagem; E - frações de eluição.

As eletroforeses das cromatografias conduzidas na presença de NaCl e com o tampão fosfato de sódio não foram realizadas, uma vez que resultaram na obtenção de praticamente todas as proteínas nas frações não retidas na coluna (Figura 4.13), indicando que não houve a separação dos fragmentos. As frações das cromatografias em que houve a recuperação dos fragmentos Fab separados do Fc foram analisadas por meio do ensaio de *Western blot* (Figura 4.15), com a finalidade de confirmar, por meio da detecção imunológica os fragmentos Fab e Fc.

Nas cromatografias conduzidas com os tampões na presença de NaCI (1,0 mol/L) praticamente todas as proteínas foram recuperadas nas frações não retidas. Em condições cromatográficas com elevadas concentrações de sal (geralmente 1,0 mol/L de NaCl), associadas a valores de pH em que os resíduos de histidina estejam desprotonados (pKa ~6,5), ligações de coordenação predominam na adsorção das proteínas no quelato metálico (Porath *et al.*, 1975). No estudo realizado por Sulkowski (1989), foi relatado que o íon metálico cobalto quelatado ao IDA, em tampões contendo NaCl, requer a presença de dois resíduos de histidinas situadas em uma  $\alpha$ -hélice e entre dois ou três aminoácidos, disponíveis para a ligação de coordenação com uma proteína. Portanto, é possível que a IgG e os fragmentos Fab e Fc não apresentem em sua estrutura os resíduos de histidina acessíveis situadas em uma  $\alpha$ -hélice e entre dois ou três aminoácidos de histidina acessíveis situadas em uma  $\alpha$ -hélice e entre dois ou três aminoácidos de histidina acessíveis situadas em uma  $\alpha$ -hélice e entre dois ou três aminoácidos de histidina acessíveis situadas em uma  $\alpha$ -hélice e entre dois ou três aminoácidos de histidina acessíveis situadas em uma  $\alpha$ -hélice e entre dois ou três aminoácidos de histidina acessíveis situadas em uma  $\alpha$ -hélice e entre dois ou três aminoácidos de histidina acessíveis situadas em uma  $\alpha$ -hélice e entre dois ou três aminoácidos de histidina acessíveis situadas em uma  $\alpha$ -hélice e entre dois ou três aminoácidos para a adsorção em CM-Asp-Co(II).

Nas cromatografias conduzidas com os tampões Tris-HCl e fosfato de sódio, na ausência de NaCl, houve menor adsorção de proteína total em comparação com as cromatogradias conduzidas com Hepes. Esse comportamento pode estar relacionado com as possíveis interações eletrostáticas entre o grupamento NH<sub>3</sub><sup>+</sup> do tampão Tris com o quelato metálico, dificultando a adsorção das proteínas. Para o tampão fosfato, é possível que interações eletrostáticas entre o oxigiênio desprotonado do fosfato com a proteína dificultaram a adsorção das proteínas ao quelato metálico.

Para o ligante CM-Asp-Co(II), nas cromatografias conduzidas com os tampões de adsorção Hepes e Tris-HCI na ausência de sal houve a recuperação seletiva dos fragmentos Fab (Figura 4.15). No entanto, com o tampão Tris-HCI, foram recuperadas somente 13,38 ± 0,91% das proteínas totais, na eluição. Em tampão Hepes, 27,12 ±

0,32% das proteínas totais foram recuperadas na eluição. Desse modo, as frações das cromatografias em CM-Asp-Co(II), com o tampão Hepes foram analisadas por RID para a determinação da pureza e do fator de purificação (Tabela 4.6). Os resultados obtidos (Tabela 4.6) indicam que 31% dos fragmentos Fab são recuperados nas frações de eluição com pureza de 91%.

Nas cromatografias realizadas com o ligante CM-Asp-Co(II) na ausência de NaCI, houve a recuperação dos fragmentos Fab nas frações de eluição separados do Fc. Esperava-se que os fragmentos Fc também fossem adsorvidos no quelato CM-Asp-Co(II), como foi relatado para os quelatos CM-Asp-Ni(II) e CM-Asp-Cu(II). No entanto, o quelato CM-Asp-Co(II) favoreceu a adsorção dos fragmentos Fab e da IgG, enquanto os fragmentos Fc foram recuperados na etapa de lavagem.

**Tabela 4.6:** Balanço de massa da cromatografia em agarose-CM-Asp-Co(II) utilizando tampão de equilíbrio e lavagem Hepes 25 mmol/L, pH 7,5; eluição: Hepes 25 mmol/L, contendo 100,0 mmol/L de imidazol, pH 7,5 e regeneração: EDTA 100 mmol/L, pH 7,0.

	Bradford	b		RI	D	
Fração	Massa (mg) <sup>a</sup>	% <sup>b</sup>	Massa (mg) <sup>c</sup>	% <sup>d</sup>	Pureza (%) <sup>e</sup>	$FP^{f}$
Injeção	$3,70 \pm 0,07$	100	$2,0 \pm 0,0$	100	54 ± 1	1,0
"pool" Lavagem	$2,94 \pm 0,09$	79,5	$1,3 \pm 0,0$	67,0	46 ± 1	0,8
"pool" Eluição	$0,68 \pm 0,05$	18,4	$0,6 \pm 0,0$	31,0	91 ± 5	1,7
"pool" Regeneração	0,09 ± 0,01	2,4	0,0			
Recuperação (%)	100,3 ± 4	,1		97,9 =	± 1,4	

<sup>a</sup> Massa de proteína total estimada pelo método de Bradford (1976), com IgG humana como proteína de referência

<sup>b</sup> Massa de proteína total em cada etapa dividida pela massa de proteína na injeção x 100

<sup>c</sup> Massa de fragmentos Fab e de IgG estimada por RID

<sup>d</sup> Massa de fragmentos Fab e de IgG em cada etapa dividida pela massa de fragmentos Fab e de IgG na injeção x 100

<sup>e</sup> Pureza: massa de fragmentos Fab e de IgG dividida pela massa de proteína total de cada etapa multiplicada por 100

<sup>1</sup>Fator de purificação: pureza dividida pela pureza da solução de injeção

# 4.3.1. Interação do CM-Asp-Co(II) com fragmento Fab

Segundo Zachariou e Hearn (2000), em condições experimentais caracterizadas por uma baixa força iônica, o ligante (agente quelante – íon metálico) exibe um

comportamento característico de trocadores iônicos. Portanto, a não adsorção dos fragmentos Fc pode estar relacionada às possíveis repulsões eletrostáticas entre essa biomolécula e o ligante.

Com a finalidade de elucidar a interação dos fragmentos com o quelato CM-Asp-Co(II), foram determinados os pontos isoelétricos dos fragmentos (Figura 4.16). No valor de pH em que as etapas de injeção e lavagem foram conduzidas em todas as cromatografias (pH 7,5), a maior proporção dos fragmento Fab (pI 6,0-9,3) apresenta-se com carga líquida positiva, enquanto o fragmento Fc (pI 5,5- 6,7) apresenta carga líquida negativa (Figura 4.16).

A focalização isoelétrica revela que os fragmentos adsorvidos em CM-Asp-Co(II) apresentam ponto isoelétrico na faixa de aproximadamente 8,0 a 9,3, portanto possuem carga líquida positiva em pH 7,5 (Figura 4.16). Desse modo, a adsorção dos fragmentos Fab ao quelato metálico e a recuperação dos fragmentos Fc nas frações de lavagem poderiam ser atribuídas a possíveis interações eletrostáticas entre os fragmentos Fab e o CM-Asp-Co(II) e a repulsão eletrostática entre os fragmentos Fc e esse quelato metálico.



**Figura 4.16:** Eletroforese de focalização isoelétrica (IEF) – M: marcador de pl de 3,5 a 9,3;  $Fab_{(LA)}$  (fragmento Fab obtido na etapa de lavagem da cromatografia realizada em Sepharose-Proteína A);  $Fc_{(EA)}$  (fragmento Fc obtido na etapa de eluição da cromatografia realizada em Sepharose-Proteína A seguida da permeação em gel);  $Fab_{(Coll)}$  (fragmento Fab obtido na etapa de lavagem da cromatografia realizada em CM-Asp-Co(II) seguida da permeação em gel).

A hipótese de que interações eletrostáticas estejam envolvidas na adsorção dos fragmentos Fab e da IgG não clivada no ligante CM-Asp-Co(II) pode ser ratificada pelo
fato de os experimentos conduzidos na presença cloreto de sódio não favorecerem a adsorção dos fragmentos Fab. Nessas condições, mais de 97% das proteínas totais foi recuperada na etapa de lavagem.

Com a finalidade de verificar se a adsorção seletiva dos fragmentos Fab ocorre em outros agentes quelantes tetradentados quelatados ao íon metálico cobalto, foram realizados experimentos cromatográficos com os adsorventes agarose-TREN-Co(II) e agarose-NTA-Co(II), utilizando a condição que possibilitou a maior recuperação de fragmentos Fab nas frações de eluição: tampão de adsorção Hepes na ausência de NaCI. Os perfis eletroforéticos das frações das cromatografias em TREN-Co(II) e NTA-Co(II) estão representados na Figura 4.17.



**Figura 4.17:** Perfil eletroforético das frações das cromatografias em (a) agarose-TREN-Co(II) e (b) agarose-NTA-Co(II) utilizando os sistemas tamponantes Hepes, pH 7,5,. M – Marcador de baixa massa molecular; IgG – Marcador de IgG; A – solução de injeção. L - frações de lavagem; E - frações de eluição; R - frações de regeneração.

Os perfis eletroforéticos indicam que com quelato TREN-Co(II) houve a recuperação dos fragmentos Fab, separados do Fc, na etapa de lavagem, enquanto com o NTA-Co(II), apenas, na etapa de regeneração. O CM-Asp, assim como o NTA, adsorvem o fragmento Fab. Esse fato pode estar relacionado com a estrutura química dos agentes quelantes. Na Figura 4.18, estão representados os anéis quelato formados entre o íon metálico e átomos dos agentes quelantes CM-Asp, TREN e NTA.

Observa-se que o CM-Asp e o NTA apresentam um átomo de nitrogênio e três átomos de oxigênio que participam da coordenação com o íon metálico. Tal semelhança entre as estruturas podem estar relacionada ao fato do fragmento Fab adsorver nesses quelatos metálicos. O resultado da cromatografia com o adsorvente agarose-CM-Asp-Co(II) empregando o tampão de adsorção Hepes sem NaCI é promissor para purificação de fragmentos Fab a partir de uma solução de IgG clivada enzimaticamente. Essa condição cromatográfica proporcionou a adsorção dos fragmentos Fab ao ligante e a recuperação desses nas frações de eluição separados do Fc, conforme indicado nas Figuras 4.15. No entanto, essa condição cromatográfica acarretou a recuperação dos fragmentos Fab junto à IgG intacta. Com a finalidade obter tais fragmentos separados do anticorpo intacto foram testadas duas condições de eluição: gradiente de concentração imidazol e gradiente de pH.



**Figura 4.18:** Estrutura química dos agentes quelante tetradentados TREN, NTA e CM-Asp (Fonte: Adaptado de GABERC-POREKAR e MENART, 2001).

# 4.3.2. Purificação de Fab em agarose-CM-Aps-Co(II): eluição por aumento da concentração de imidazol e por diminuição do pH

A eluição em gradiente degrau por adição de agente competidor (imidazol) no tampão de adsorção e por diminuição gradativa do pH foram empregadas nas cromatografias conduzidas com o ligante CM-Asp-Co(II) (Figura 4.19).

Esperava-se que a força de interação entre fragmento Fab e o quelato metálico e entre IgG não clivada e o quelato metálico fossem diferentes quanto a intensidade, de modo que concentrações específicas de imidazol ou determinados valores de pH proporcionariam a obtenção dos fragmentos Fab separados da IgG não clivada. Os resultados indicam que toda proteína adsorvida ao quelato metálico CM-Asp-Co(II) foi

recuperada na eluição com 20 mmol/L de imidazol e nos valores de pH 6,0 e 5,0. O tampão de adsorção Hepes pH 7,5 sem NaCl, associado a eluição das proteínas adsorvidas por aumento gradativo da concentração de imidazol ou diminuição gradativa do pH, não possibilitou a separação dos fragmentos Fab da IgG não clivada.



**Figura 4.19:** Perfil eletroforético de adsorção de fragmentos de IgG a partir solução de IgG clivada em agarose-CM-Asp-Co(II) utilizando sistema tamponante Hepes sem NaCl, pH 7,5. M – Marcador de baixa massa molecular; IgG – Marcador de IgG; A – solução de injeção. L: Lavagem com tampão Hepes sem NaCl , pH 7,5. (a)  $E_1$ : Eluição com tampão Hepes contendo 20 mmol/L de imidazol, pH 7,5; (b)  $E_2$ : Eluição com tampão acetato pH 6,0;  $E_3$ : Eluição com tampão acetato pH 5,0.

# 4.3.3. Determinação da capacidade de adsorção dinâmica do adsorvente agarose-CM-Asp-Co(II)

Foram realizados experimentos para determinação da curva de ruptura no adsorvente agarose-CM-Asp-Co(II) em Hepes como tampão de adsorção com a finalidade de determinar a capacidade dinâmica e a seletividade do adsorvente. Essa condição cromatográfica foi selecionada por ter proporcionado a recuperação dos fragmentos Fab nas frações de eluição, separado dos fragmentos Fc. A curva de ruptura e o perfil eletroforético estão apresentados na Figura 4.20 e Figura 4.21, o *Western blot* na Figura 4.22 e o balanço de massa na Tabela 4.7. A duplicata do cromatograma e da eletroforese, e balanços de massas dessas condições estão no Apêndice D.

Os resultados de *Western blot e* RID confirmam o perfil eletroforético e indicam que os fragmentos Fab são recuperados com elevada pureza nas frações de eluição

(96% de pureza), porém contendo IgG não clivada. A capacidade dinâmica de adsorção de Fab foi de 5,7 mg de proteínas/mL de gel.



**Figura 4.20:** (a) Curva de ruptura no gel agarose-CM-Asp-Co(II) utilizando sistema tamponante Hepes, em pH 7,5. Leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. I: Injeção de 86,0 mL de solução de IgG humana clivada na concentração de 2,09 mg/mL (concentração de proteína total estimada pelo método de Bradford, com BSA como proteína de referência). (b) L: Lavagem com tampão Hepes 25 mmol/L, pH 7,5. E: Eluição com tampão Hepes, contendo 100,0 mmol/L de imidazol, pH 7,5. R: Regeneração com EDTA 100 mmol/L, pH 7,0.

Comparando as curvas de ruptura entre o quelato CM-Asp-Ni(II) com o tampão de adsorção Hepes com NaCI, CM-Asp-Cu(II) com o tampão de adsorção fosfato de sódio com NaCI e CM-Asp-Co(II) com o tampão de adsorção Hepes na ausência de NaCI, observa-se que nos quelatos metálicos CM-Asp-Ni(II) e CM-Asp-Cu(II) 3,4 mg e 8,6 mg fragmentos Fab, respectivamente, são obtidos por cromatografia negativa (nas frações cromatográficas não retidas) a qual apresenta como aspecto negativo a diluição da proteína de interesse. No entanto, com o quelato metálico CM-Asp-Co(II), 17,1 mg dos fragmentos Fab são obtidos nas frações de eluição separados do Fc. A purificação dos fragmentos Fab no CM-Asp-Co(II) apresenta algumas vantagens em relação a purificação nos quelatos CM-Asp-Ni(II) e CM-Asp-Cu(II), uma vez que no quelato CM-Asp-Co(II) é obtida uma maior quantidade de fragmentos Fab separados do Fc e os fragmentos Fab são obtidos nas frações de eluição.



**Figura 4.21:** Gel de eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras: M – Marcador de baixa massa molecular; IgG – Marcador de IgG; A – Fração de injeção:  $F_7$  – *flowthrough* (fração 7);  $F_{22}$  – *flowthrough* (fração 22);  $F_{44}$  – *flowthrough* (fração 44);  $F_{45}$  – *flowthrough* (fração 45);  $L_{51}$  – Lavagem (fração 51);  $L_{106}$  – Lavagem (fração 1106);  $E_{156}$  – Eluição (fração 156);  $E_{157}$  – Eluição (fração 157);  $E_{158}$  – Eluição (fração 158);  $E_{159}$  – Eluição (fração 159).



**Figura 4.22:** Perfil do *Western blot* das frações cromatográficas realizadas em agarose-CM-Asp-Co(II) em sistema tamponante Hepes em pH 7,5. Lavagem com tampão Hepes pH 7,5. Eluição com tampão Hepes contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5. Regeneração com EDTA 100 mmol/L, pH 7,0. Membrana de nitrocelulose: Mc – Marcador de massa molecular précorado; Inj – solução de injeção; F- "pool" do *flowthrough*; L – "pool" da lavagem; E – "pool" da eluição.

**Tabela 4.7:** Balanço de massa por imunodifusão radial (RID) das frações de injeção e eluição da curva de ruptura em agarose-CM-Asp-Co(II) em tampão de equilíbrio e lavagem Hepes pH 7,5; eluição: Hepes contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5 e regeneração: EDTA 100 mmol/L, pH 7,0.

	Bradford			RID		
Fração	Massa (mg) <sup>a</sup>	% <sup>b</sup>	Massa (mg) <sup>c</sup>	% <sup>d</sup>	Pureza (%) <sup>e</sup>	$FP^{f}$
Injeção	224,67 ± 0,81	100	$128,2 \pm 2,4$	100	57 ± 1	1,0
"pool" FT	159,44 ± 1,53	71,0	$79,7 \pm 0,7$	62,2	50 ± 1	0,9
"pool" Lavagem	30,34 ± 1,27	13,5	$22,8 \pm 0,0$	17,8	75 ± 3	1,3
"pool" Eluição	17,88 ± 0,08	8,0	17,1 ± 0,3	13,3	96 ± 2	1,5
"pool" Regeneração	0,00					
Recuperação (%)	92,4 ± 0,5			93,4 ±		

<sup>a</sup> Massa de proteína total estimada pelo método de Bradford (1976), com IgG humana como proteína de referência

<sup>b</sup> Massa de proteína total em cada etapa dividida pela massa de proteína na injeção x 100

<sup>c</sup> Massa de fragmentos Fab e de IgG estimada por RID

<sup>d</sup> Massa de fragmentos Fab e de IgG em cada etapa dividida pela massa de fragmentos Fab e de IgG na injeção x 100

<sup>e</sup> Pureza: massa de fragmentos Fab e de IgG dividida pela massa de proteína total de cada etapa multiplicada por 100

<sup>f</sup>Fator de purificação: pureza dividida pela pureza da solução de injeção

#### 4.4. Efeito do íon metálico zinco na purificação de fragmentos Fab

De acordo com Sulkowski (1989) o íon metálico zinco quelatado ao IDA requer a presença de dois resíduos de histidinas situadas em uma α-hélice e entre dois ou três aminoácidos e disponíveis para a ligação de coordenação com uma proteína. No estudo de Todorova-Balvay (2004) foi demonstrado que os fragmentos Fc apresentam um presença do cluster de histidina, His 433-X-His 435 acessível, no fragmento Fc de IgG humana policional. Baseando-se nesses estudos, espera-se uma adsorção seletiva dos fragmentos Fc e da IgG intacta ao quelato metálico, enquanto maior quantidade de fragmentos Fab seja recuperada nas frações não retidas na coluna, quando comparado com os quelatos metálicos CM-Asp-Ni(II),CM-Asp-Cu(II) e CM-Asp-Co(II).

As Figuras 4.23 e 4.24 demonstram as porcentagens de proteínas adsorvidas e os perfis eletroforéticos, respectivamente, dos ensaios cromatográficos. Os cromatogramas, eletroforeses (em duplicata) e balanços de massas dessas condições estão apresentados no Apêndice E.



**Figura 4.23:** Porcentagem de proteínas totais adsorvidas e não adsorvidas das cromatografias realizadas no quelato metálico CM-Asp-Zn(II) empregando os tampões de adsorção Hepes, Tris-HCI e fosfato de sódio na ausência e presença de cloreto sódio. Quantidade de metal: 4,34 µmol Zn(II)/mL de gel

Para o ligante CM-Asp-Zn(II), as cromatografias conduzidas com os tampões de adsorção Hepes e Tris-HCI na presença de NaCI e fosfato de sódio sem NaCI resultaram na recuperação de praticamente todas as proteínas nas frações de lavagem. Nas cromatografias realizadas com os tampões na ausência de sal, observa-se que a quantidade de proteína adsorvida é menor quando são empregados os tampões Tris-HCI e fosfato de sódio. Tal comportamento pode estar relacionado à competição dos grupamentos químicos dos tampões fosfato e Tris-HCI pelo sítio de adsorção.

Nas cromatografias realizadas com o tampão Hepes e Tris-HCl, na ausência de sal, não houve a recuperação seletiva dos fragmentos Fab como indicado no perfil eletroforético e no ensaio de *Western blot* (Figura 4.24 e 4.25). Os fragmentos Fab e Fc foram obtidos nas frações de lavagem e eluição.

Nas cromatografias conduzidas na presença de NaCI, praticamente todas as proteínas foram recuperadas nas frações não retidas. Esse comportamento foi semelhante ao encontrado para o quelato metálico CM-Asp-Co(II).



**Figura 4.24:** Perfil eletroforético das frações cromatográficas dos experimentos em agarose-CM-Asp-Zn(II) utilizando os sistemas tamponantes Hepes, Tris-HCI e fosfato de sódio pH 7,5, na ausência e presença de cloreto de sódio. M – Marcador de baixa massa molecular; IgG – Marcador de IgG; A – Solução de injeção. L - Lavagem; E - Eluição.



**Figura 4.25:** Western blot das frações cromatográficas dos experimentos em agarose-CM-Asp-Zn(II) utilizando sistema tamponante (a) Tris-HCI na presença de NaCI Mc – Marcador de massa molar; IgG – Marcador de IgG; L - Lavagem E - Eluição.

As eletroforeses das cromatografias conduzidas na presença de NaCl e com o tampão fosfato de sódio não foram realizadas, uma vez que resultaram na recuperação de praticamente todas as proteínas nas frações não retidas na coluna (Figura 4.23), indicando que não houve a separação dos fragmentos.

#### **CAPÍTULO 5: CONCLUSÕES**

Neste trabalho, foi avaliada a purificação dos fragmentos Fab obtidos por meio da clivagem enzimática de IgG humana nos quelatos metálicos CM-Asp-Ni(II), CM-Asp-Cu(II), CM-Asp-Co(II) e CM-Asp-Zn(II) empregando os sistemas tamponantes Hepes, Tris-HCI e fosfato de sódio na ausência e presença de NaCI.

Este estudo demonstrou que os quelatos metálicos avaliados e as condições experimentais em que as cromatografias foram conduzidas proporcionaram uma diversidade na pureza de fragmentos Fab e na quantidade de proteínas obtidas nas etapas de lavagem e eluição.

Nas cromatografias realizadas com o adsorvente agarose-CM-Asp-Ni(II) com o tampão de adsorção Hepes e fosfato de sódio na presença de NaCI e o adsorvente agarose-CM-Asp-Cu(II) em tampões Tris-HCI e fosfato de sódio na presença de NaCI (1,0 mol/L), houve a recuperação dos fragmentos Fab, separados dos Fc, nas frações não retidas (cromatografia negativa). Na presença de sal, a adsorção das proteínas nesses quelatos metálicos ocorreu principalmente por ligações de coordenação.

Nas cromatografias com o ligante CM-Asp-Co(II), obteve-se um comportamento peculiar, uma vez que os fragmentos Fab foram recuperados nas frações de eluição (cromatografia tradicional), separados do Fc, apenas nas cromatografias conduzidas com os tampões de adsorção Hepes e Tris-HCI, na ausência de sal. Nessas condições, provavelmente as interações eletrostáticas predominaram na adsorção dos fragmentos Fab no quelato metálico CM-Asp-Co(II).

Nas cromatografias com o quelato metálico CM-Asp-Zn(II), não houve a recuperação dos fragmentos Fabs seletivamente nos sistemas tamponantes empregados.

Os resultados das curvas de ruptura dos adsorventes agarose-CM-Asp-Ni(II), agarose-CM-Asp-Co(II) e agarose-CM-Asp-Cu(II) revelaram a recuperação de 3,4 mg, 17,1 mg e 8,6 mg de Fab, respecticamente. Os fragmentos Fab foram obtidos com pureza superior a 90%, sendo que para o ligante CM-Asp-Cu(II), segundo o *western blot,* os fragmentos Fab foram separados da IgG não clivada.

Os resultados obtidos nas condições cromatográficas estudadas evidenciam a potencialidade do emprego dos quelatos CM-Asp-Ni(II), CM-Asp-Co(II) e CM-Asp-Cu(II) imobilizados em agarose para purificação de fragmentos Fab obtidos da clivagem enzimática da IgG humana policional.

## CAPÍTULO 6: SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Diante da potencialidade dos quelatos metálicos para a purificação de fragmentos Fab obtidos por meio da clivagem enzimática de IgG humana é relevante a continuidade de pesquisas neste tema. Portanto, é sugerido para os próximos trabalhos:

- avaliar a eficácia dos quelatos metálicos na purificação de fragmentos Fab de digestão enzimática de anticorpos monoclonais
- avaliar a eficácia de outras matrizes cromatográficas
- realizar estudos termodinâmicos para verificar a natureza da adsorção de anticorpos nos quelatos metálicos
- realizar experimentos em larga escala

### CAPÍTULO 7: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. Antibodies and Antigens. In: Cellular and Molecular Immunology. 5.ed. Elsevier Science Editorial; 2004, p.53-64.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular Biology of the Cell**. 5. ed. New York: Garland Science, 2008.
- ANURAJ, N.; BHATTACHARJEE, S.; GEIGER, J.H.; BAKER, G.L.; BRUENING, M.L. An all-aqueous route to polymer brush-modified membranes with remarkable permeabilites and protein capture rates. **Journal of Membrane Science**, v.389, p.117-125, Febuary 2012.
- ARNOLD, F. H. Metal-Affinity Separations a New Dimension in Protein Processing. **Bio-Technology**, v.9, n.2, p.151-156, Febuary 1991.
- AYYAR, B.V.; ARORA, S.; MURPHY, C., O'KENNEDY, R. Affinity chromatography as a tool for antibody purification. **Methods**, v.56, n.2, p.116-129, Febuary 2012.
- BERELI, N.; AKGOL, S.; YAVUZ, H., DENIZLI, A. Antibody purification by concanavalin a affinity chromatography. **Journal of Applied Polymer Science**, v.97, n.3, p.1202-1208, August 2005.
- BOSCHETTI, E. The use of thiophilic chromatography for antibody purification: a review. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v.49, n.1-3, p.361-389, October 2001.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
- BRANCO, R. J. F.; DIAS, A. M. G. C.; ROQUE, A. C. A. Understanding the molecular recognition between antibody fragments and protein A biomimetic ligand. Journal of Chromatography A, v.1244, p.106-115, June 2012.
- BRESOLIN, I.R.A.P.; BRESOLIN, I.T.L.; MIRANDA, E.A.; BUENO, S.M.A. Negative chromatography on agarose-TREN as a technique for purification of protein spiked in soybean seeds extract. **Process Biochemistry**, v.47, n.12, p.2255-2261, December 2012.
- BRESOLIN, I.T.L.; BORSOI-RIBEIRO, M.; TAMASHIRO, W.M.S.C.; AUGUSTO, E.F.P.; VIJAYALAKSHMI, M.A.; BUENO, S.M.A. Evaluation of Immobilized Metal-Ion Affinity Chromatography (IMAC) as a Technique for IgG(1) Monoclonal Antibodies

Purification: The Effect of Chelating Ligand and Support. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.160, n.7, p.2148-2165, April 2010.

- BRESOLIN, I.T.L; MIRANDA, E.A; BUENO, S.M.A. Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) de biomoléculas: Aspectos fundamentais e aplicações tecnológicas. Quimica Nova, v.32, n.5, p.1288-1296, 2009.
- BUENO, S.M.A.; HAUPT, K.; VIJAYALASKHMI, M.A. Separation of immunoglobulin G from human serum by pseudobioaffinity chromatography using immobilized Lhistidine in hollow fibre membranes. Journal of Chromatography B- Biomedical Sciences and Applications, v.667, n.1, p.57-67, May 1995.
- BURNOUF, T.; RADOSEVICH, M. Affinity chromatography in the industrial purification of plasma proteins for therapeutic use. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v.49, n.1-3, p.575-586, October 2001.
- CARAMELO-NUNES, C.; GABRIEL, M.P.; ALMEIDA, P.; MARCOS, J.C.; TOMAZ, C.T. Negative pseudo-affinity chromatography for plasmid DNA purification using berenil as ligand. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, v.944, p.39-42, January 2014.
- CARVALHO, B.M.A.; CARVALHO, L.M.; SILVA, W.F.; MINIM, L.A.; SOARES, A.M.; CARVALHO, G.G.P.; DA SILVA, S.L. Direct capture of lactoferrin from cheese whey on supermacroporous column of polyacrylamide cryogel with copper ions. **Food Chemistry**, v.154, p.308-314, July 2014.
- CASEY, J.L.; KEEP, P.A.; CHESTER, K.A.; ROBSON, L.; HAWKINS, R.E.; BEGENT, R.H.J. Purification of Bacterially Expressed Single-Chain Fv Antibodies for Clinical-Applications Using Metal Chelate Chromatography. Journal of Immunological Methods, v.179, n.1, p.105-116, Febuary 1995.
- CALBIOCHEM. Disponível em: <a href="http://www.emdmillipore.com/life-science-research/hepes-free-acid-ultrol-grade-cas-7365-45-9-calbiochem/EMD\_BIO-391338/p\_lzGb.s1LAAYAAAEWhmEfVhTm">http://www.emdmillipore.com/life-science-research/hepes-free-acid-ultrol-grade-cas-7365-45-9-calbiochem/EMD\_BIO-391338/p\_lzGb.s1LAAYAAAEWhmEfVhTm</a>>. Acesso em 20 de Janeiro de 2014.
- CHAGA, G.; HOPP, J.; NELSON, P. Immobilized metal ion affinity chromatography on Co2+-carboxymethylaspartate-agarose Superflow, as demonstrated by one-step purification of lactate dehydrogenase from chicken breast muscle. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v.29, p.19-24, Febuary 1999.
- CHAMES, P.; VAN REGENMORTEL, M.; WEISS, E.; BATY, D. Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future. **British Journal of Pharmacology**, v.157, n.2, p.220-233, May 2009.
- CHEUNG, G.L.M.; THOMAS, T.M.; RYLATT, D.B. Purification of antibody Fab and F(ab ')2 fragments using Gradiflow technologyl. **Protein Expression and Purification**, v.32, n.1, p.135-140, November 2003.
- CHEUNG, R.C.F.; WONG, J.H.; NG, T.B. Immobilized metal ion affinity chromatography: a review on its applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.96, n.6, p.1411-1420, December 2012.

- CHOTTARD, J.C., DEPEZAY, J.C. e LEROUX, J.P. Chimie fondamentale –Études biologiques et médicales, II. Structure moléculaire, Paris: Hermann Éditeurs dessciences et des arts, 1992.
- COFFINIER, Y.; VIJAYALAKSHMI, M.A. Mercaptoheterocyclic ligands grafted on a poly(ethylene vinyl alcohol) membrane for the purification of immunoglobulin G in a salt independent thiophilic chromatography. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, v.808, n.1, p.51-56, August 2004.
- COLEMAN, L.; MAHLER, S.M. Purification of Fab fragments from a monoclonal antibody papain digest by Gradiflow electrophoresis. **Protein Expression and Purification**, v.32, n.2, p.246-251, December 2003.
- CONSTANTINOU, A.; CHEN, C.; DEONARAIN, M P. Modulating the pharmacokinetics of therapeutic antibodies. **Biotechnology Letters**, v.32, n.5, p.609-622, May 2010.
- da SILVA, L.; SERRACCHIANI, M.M.; MIRANDA, E.A.; BUENO, S.M.A. Separation of human Fab fragments on negative modeNi(II)-TREN-agarose chromatography. Process Biochemistry, v.49, n.4, p.715-723, April 2014.
- DAVIES, H.A.; WILKINSON, M.C.; GIBSON, R.P.; MIDDLETON, D.A. Expression and purification of the aortic amyloid polypeptide medin. **Protein Expression and Purification**, v.98, p.32-37, June 2014.
- de GENARO, A.C.B.; TAMAGAWA, R.E.; AZZONI, A.R.; BUENO, S.M.A.; MIRANDA, E.A. Recovery and purification of aprotinin from industrial insulin-processing effluent by immobilized chymotrypsin and negative IMAC chromatographies. **Process Biochemistry**, v.37, n.12, p.1413-1420, July 2002.
- de GOES, L.C.; MIRANDA, E.A; BUENO, S.M.A. Interaction of histidine-tagged human proinsulin with immobilized nickel ion: Effect of chelating ligand and thermodynamics analysis. **Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects**, v.369, n.1-3, p.176-185, October 2010.
- de SOUZA, M.C.M.; BRESOLIN, I.T.L.; BUENO, S.M.A. Purification of human IgG by negative chromatography on omega-aminohexyl-agarose. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, v.878, n.5-6, p.557-566, Febuary 2010.
- DENIZLI, A. Purification of Antibodies by Affinity Chromatography. **Hacettepe Journal** of Biology and Chemistry, v.39, n.1, p.1-18, April 2011.
- DENNIS, M.S.; JIN, H.K.; DUGGER, D.; YANG, R.H.; MCFARLAND, L.; OGASAWARA, A.; WILLIAMS, S.; COLE, M.J.; ROSS, S.; SCHWALL, R. Imaging tumors with an albumin-binding Fab, a novel tumor-targeting agent. Cancer Research, v.67, n.1, p.254-261, January 2007.
- DERRICK, J.P.; WIGLEY, D.B. The 3rd IgG-Binding Domain from Streptococcal Protein-G - an Analysis by X-Ray Crystallography of the Structure Alone and in a Complex

with Fab. Journal of Molecular Biology, v.243, n.5, p.906-918, November 1994.

- DEWBERRY, E.J.; DUNKERLEY, E.; DUFFY, C. Purification of full-length VP22 from cells infected with HSV-1: A two-pronged approach for the solubilization and purification of viral proteins for use in biochemical studies. Journal of Virological Methods, v.183, n.2, p.180-185, August 2012.
- ELBAKRI, A.; NELSON, P.N.; ABU, R.O. The state of antibody therapy. **Human Immunology**, v.71, n.12, p.1243-1250, December 2010.
- ERTURK, G.; UZUN, L.; TUMER, M.A.; SAY, R.; DENIZLI, A. F-ab fragments imprinted SPR biosensor for real-time human immunoglobulin G detection. **Biosensors & Bioelectronics**, v.28, n.1, p.97-104, October 2011.
- FISCHER, I.; HSU, C.C.; GARTNER, M.; MULLER, C.; OVERTON, T.W.; THOMAS, O.R.T.; FRANZREB, M. Continuous protein purification using functionalized magnetic nanoparticles in aqueous micellar two-phase systems. Journal of Chromatography A, v.1305, p.7-16, August 2013.
- GABERC-POREKAR, V.; MENART, V. Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, v.49, n.1-3, p.335-360, October 2001.
- GAGNON, P. Technology trends in antibody purification. **Journal of Chromatography A**, v.1221, p.57-70, January 2012.
- GAGNON, P.; CHEUNG, C.W.; YAZAKI, P.J. Reverse calcium affinity purification of Fab with calcium derivatized hydroxyapatite. **Journal of Immunological Methods**, v.342, n.1-2, p.115-118, March 2009.
- GODING, J.W. Monoclonal Antibodies: Principles and Practice. 3.ed. Academic Press, 1983. Cap. IX: Purification, Fragmentation and Isotopic Labelling of Monoclonal Antibodies p. 56-97.
- GOMES, A.G.; AZEVEDO, A.M.; AIRES-BARROS, M.R.; PRAZERES, D.M.F. Studies on the adsorption of cell impurities from plasmid-containing lysates to phenyl boronic acid chromatographic beads. **Journal of Chromatography A**, v.1218, n.48, p.8629-8637, December 2011.
- GUERRIER, L.; FLAYEUX, I.; BOSCHETTI, E. A dual-mode approach to the selective separation of antibodies and their fragments. **Journal of Chromatography B**, v.755, n.1-2, p.37-46, May 2001.
- GUTIÉRREZ, R., VALLE, E.M., MARTÍN DEL VALE, E.M. e GALÁN, M.A. Immobilized Metal-Ion Affinity Chromatography: Status and Trends. **Separation and Purification Reviews**, v.36, n.1, p.71-111, January 2007.
- HALE, J.E.; BEIDLER, D.E. Purification of humanized murine and murine monoclonal antibodies using immobilized metal-affinity chromatography. Analytical Biochemistry. v.222, n.1, p.29-33, October 1994

- HANSEL, T.T.; KROPSHOFER, H.; SINGER, T.; MITCHELL, J.A.; GEORGE, A.J.T. The safety and side effects of monoclonal antibodies. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.9, n.4, p.325-338, April 2010.
- HJERTEN, S. Chromatographic Separation According to Size of Macromolecules and Cell Particles on Columns of Agarose Suspensions. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.99, n.3, p.466, 1962.
- HOLLIGER, P.; HUDSON, P.J. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. **Nature Biotechnology**, v.23, n.9, p.1126-1136, September 2005.
- HORI, T.; SATO, Y.; TAKAHASHI, N.; TAKIO, K.; YOKOMIZO, T.; NAKAMURA, M.; SHIMIZU, T.; MIYANO, M. Expression, purification and characterization of leukotriene B-4 receptor, BLT1 in Pichia pastoris. **Protein Expression and Purification**, v.72, n.1, p.66-74, July 2010.
- HUSE, K.; BOHME, H.J.; SCHOLZ, G.H. Purification of antibodies by affinity chromatography. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, v.51, n.3, p.217-231, May 2002.
- HYYTIA, H.; JARVENPAA, M.L.; RISTINIEMI, N.; LOVGREN, T.; PETTERSSON, K. A comparison of capture antibody fragments in cardiac troponin I immunoassay. **Clinical Biochemistry**, v.46, n.12, p.963-968, August 2013.
- ISHIHARA, T.; KADOYA, T.; YOSHIDA, H.; TAMADA, T.; YAMAMOTO, S. Rational methods for predicting human monoclonal antibodies retention in protein A affinity chromatography and cation exchange chromatography - Structure-based chromatography design for monoclonal antibodies. Journal of Chromatography A, v.1093, n.1-2, p.126-138, November 2005.
- JANSON, J.; RYDÉN, L. Protein Purification Principles, High Resolution Methods and Applications. Uppsala:, 1989.
- JIANG, C.P.; WECHUCK, J.B.; GOINS, W.F.; KRISKY, D.M.; WOLFE, D.; ATAAI, M.M.; GLORIOSO, J.C. Immobilized cobalt affinity chromatography provides a novel, efficient method for herpes simplex virus type 1 gene vector purification. Journal of Virology, v.78, n.17, p.8994-9006, September 2004.
- KAGEDAL, L. Immobilized metal ion affinity chromatography. In: Jason, J. Protein Purification: Principles, High Resolution Methods and Applications. 3.ed. John Wiley & Sons, Inc.; 2011, p.183-201
- KAMIMURA, E.S.; MAUGERI, F. Cromatografia de afinidade. In: PESSOA JR.; A.; KILIKIAN, B. V. Purificação de Produtos Biotecnológicos. Barueri: Manole, 2005. p. 231-247.
- KARLSSON, E.; HIRSH, I. Ion Exchange Chromatography. In: Jason, J. Protein Purification: Principles, High Resolution Methods, and Applications. 3.ed. John Wiley & Sons, Inc.; 2011, p.93-133.

- KHOURY G.E.; LOWE C.R. A biomimetic Protein G affinity adsorbent: an Ugi ligand for immunoglobulins and Fab fragments based on the third IgG-binding domain of Protein G. Journal of Molecular Recognition, v.26, n.4, p.190-200, April 2013.
- KIRK, W.R. Thermodynamics of imidazole-ligand binding to Ni-nitrilotriacetate in solution and covalently attached to agarose beads: Imidazole, his-6 (his-tag) peptide and a new bis-imidazolo-dithiane. **Protein Expression and Purification**, v.95, p.1-7, March 2014.
- KURASAWA, J.H.; SHESTOPAL, S.A.; JHA, N.K.; OVANESOV, M.V.; LEE, T.K.; SARAFANOV, A.G. Insect cell-based expression and characterization of a singlechain variable antibody fragment directed against blood coagulation factor VIII. **Protein Expression and Purification**, v.88, n.2, p.201-206, April 2013.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of Structural Proteins during Assembly of Head of Bacteriophage-T4. **Nature**, v.227, n.5259, p.680-685,1970.
- LAMPPA, J.W.; TANYOS, S.A.; GRISWOLD, K.E. Engineering *Escherichia coli* for soluble expression and single step purification of active human lysozyme. **Journal of Biotechnology**, v.164, n.1, p.1-8, March 2013.
- LATHROP, J.T.; FIJALKOWSKA, I.; HAMMOND, D. The Bead blot: A method for identifying ligand-protein and protein-protein interactions using combinatorial libraries of peptide ligands. **Analytical Biochemistry**, v.361, n.1, p.65-76, Febuary 2007.
- LEE, M.F.X.; CHAN, E.S.; TEY, B.T. Negative Chomatography: Progress, applications and future perspectives. **Process Biochemistry**, v.49, n.6, p.1005-1011, June 2014.
- LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. 3ª ed.; São Paulo: Sarvier, 2002.
- LENHARDT, A.; PLEBANI, A.; MARCHETTI, F.; GERARDUZZI, T.; NOT, T.; MEINI, A.; VILLANACCI, V.; MARTELOSSI, S.; VENTURA, A. Role of human-tissue transglutaminase IgG and anti-gliadin IgG antibodies in the diagnosis of coeliac disease in patients with selective immunoglobulin A deficiency. **Digestive and Liver Disease**, v.36, n.11, p.730-734, November 2004.
- LIN, Z.Y.; ZHANG, Y.X.; LI, C.J.; QIAN, H. Purification antibody by thiophilic magnetic sorbent modified with 2-mercapto-1-methylimidazol. Colloids and Surfaces B-Biointerfaces, v.108, p.72-79, August 2013.
- LIOU, C.L.; CHEN, Y.C.; LIN, S.C. A poly(2-hydroxyethyl methacrylate)-based immobilized metal affinity chromatography adsorbent for protein purification. Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers, v.39, n.4, p.329-336, July 2008.
- LU, X.S.; MILLER, C.J. Concentration of IgG in the sera of normal rhesus macaques as determined by a species-specific radial immunodiffusion assay. **Journal of Immunological Methods**, v.197, n.1-2, p.193-196, October 1996.

- LUND, L.N.; GUSTAVSSON, P.E.; MICHAEL, R.; LINDGREN, J.; NORSKOV-LAURITSEN, L.; LUND, M.; HOUEN, G.; STABY, A.; HILAIRE, P.M. Novel peptide ligand with high binding capacity for antibody purification. **Journal of Chromatography A**, v.1225, p.158-167. Febuary 2012.
- LUTOMSKI, D.; JOUBERTCARON, R.; BOURIN, P.; BLADIER, D.; CARON, M. Use of Thiophilic Adsorption in the Purification of Biotinylated Fab Fragments. **Journal of Chromatography B-Biomedical Applications**, v.664, n.1, p.79-82, Febuary 1995.
- LV, Y.; BAO, X.; LIU, H.; REN, J.; GUO, S. Purification and characterization of cacliumbinding soybean protein hydrolysates by Ca2+/Fe3+ immobilized metal affinity chromatography (IMAC). Food Chemistry, v.141, n.3, p.1645-1650, December 2013.
- MANCINI, G.; CARBONARA, A.O.; HEREMANS, J.F. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. **Immunochemistry**, v.2, n.3, p.235-254, September 1965.
- MANTOVAARA, T.; PERTOFT, H.; PORATH, J. Carboxymethylated aspartic acid agarose, a selective adsorbent for calcium-binding proteins, preliminary studies. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v.13, n.3, p. 315-322, 1991.
- MARASCO, W.A.; SUI, J. The growth and potential of human antiviral monoclonal antibody therapeutics. **Nature Biotechnology**, v.25, n.12, p. 1421-1434, December 2007.
- MEULENBROEK, A. J. Human IgG subclasses: useful diagnostic markers for immunocompetence. Sanquin Plesmanlaan. 3.ed: Amsterdam, 2008.
- MIETHE, S.; MEYER, T.; WOHL-BRUHN, S.; FRENZEL, A.; SCHIRRMANN, T.; DUBEL, S.; HUST, M. Production of single chain fragment variable (scFv) antibodies in Escherichia coli using the LEX (TM) bioreactor. Journal of Biotechnology, v.163, n.2, p.105-111, January 2013.
- MING, Tsai Yuan. Estudo comparativo entre os adsorventes agarose-CM-Asp-Co<sup>2+</sup> e agarose-IDA-Co<sup>2+</sup> na adsorção de IgG humana. 2011. 148 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2011.
- MINOURA, I.; HACHIKUBO, Y.; YAMAKITA, Y.; TAKAZAKI, H.; AYUKAWA, R.; UCHIMURA, S.; MUTO, E. Overexpression, purification, and functional analysis of recombinant human tubulin dimer. Febs Letters, v.587, n.21, p.3450-3455, November 2013.
- MOHAN, C. Buffers A guide for the preparation and use of buffers in biological systems. EMD Biosciences. Alemanha 2003
- MONDAL, K.; GUPTA, M.N. The affinity concept in bioseparation: Evolving paradigms and expanding range of applications. **Biomolecular Engineering**, v.23, n.2-3, p.59-76, June 2006.

- MORRISSEY, J.H. Silver Stain for Proteins in Polyacrylamide Gels a Modified Procedure with Enhanced Uniform Sensitivity. **Analytical Biochemistry**, v.117, n.2, p.307-310, 1981.
- MRABET, N.T; VIJAYALAKSHMI, M. A. Immobilized metal-ion affinity chromatography -From phenomenological hallmarks to structure-based molecular insights. In: Vijayalakshmi, M. A. Biochromatography. Theory and practice. Taylor and Francis, 2002.
- MUSA, H.H.; ZHANG, W.J.; LV, J.; DUAN, X.L.; YANG, Y.; ZHU, C.H.; LI, H.F.; CHEN, K.W.; MENG, X.; ZHU, G.Q. The molecular adjuvant mC3d enhances the immunogenicity of FimA from type I fimbriae of Salmonella enterica serovar Enteritidis. J Microbiol Immunol Infect, v.47, n.1, p.57-62, Febuary 2014.
- NISHIKAWA, K.; ASAI, T.; SHIGEMATSU, H.; SHIMIZU, K.; KATO, H.; ASANO, Y.; TAKASHIMA, S.; MEKADA, E.; OKU, N.; MINAMINO, T. Development of anti-HB-EGF immunoliposomes for the treatment of breast cancer. **Journal of Controlled Release**, v.160, n.2, p.274-280, June 2012.
- PARSLOW, T. G. Immunoglobulins & Immunoglobulins Genes. In: STITES, D. P.; TERR, A. T.; PARSLOW, T. G. Medical Immunology. 9. Ed. Appleton & Lange, 1997, p.95-114.
- PAVAN, Gisele Luiza. Efeito do íon metálico, do sistema tamponante e do sal (NaCI) na adsorção de IgG humana em fibras ocas derivatizadas com CM-Asp. 2011. 136 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2011.
- PEARSON, R. G. Hard and Soft Acids and Bases Hsab .2. Underlying Theories. Journal of Chemical Education, v.45, n.10, p.643-&. 1968.
- PHAN, T.C.A.; NOWAK, K.J.; AKKARI, P.A.; ZHENG, M.H.; XU, J.K. Expression of caltrin in the baculovirus system and its purification in high yield and purity by cobalt (II) affinity chromatography. **Protein Expression and Purification**, v.29, n.2, p.284-290, June 2003.
- PILLAY, V.; GAN, H.K.; SCOTT, A. M. Antibodies in oncology. **New Biotechnology**, v.28, n.5, p.518-529, September 2011.
- PORATH, J.; AXEN, R.; ERNBACK, S. Chemical Coupling of Proteins to Agarose. **Nature**, v.215, n.1, p.1491-1492, September 1967.
- PORATH, J. High-Performance Immobilized-Metal-Ion Affinity-Chromatography of Peptides and Proteins. **Journal of Chromatography**, v.443, p.3-11, June 1988.
- PORATH, J. Immobilized Metal-Ion Affinity-Chromatography. **Protein Expression and Purification**, v.3, n.4, p.263-281, August 1992.
- PORATH, J., CARLSSON, J., OLSSON, I., BELFRAGE, G. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. **Nature**, v. 258, p. 598-599,1975.

- PORATH, J.; OLIN, B. Immobilized Metal-Ion Affinity Adsorption and Immobilized Metal-Ion Affinity-Chromatography of Biomaterials - Serum-Protein Affinities for Gel-Immobilized Iron and Nickel Ions. **Biochemistry**, v.22, n.7, p.1621-1630, 1983.
- PRASANNA, R.R.; VIJAYALAKSHMI, M.A. Immobilized metal-ion affinity systems for recovery and structure-function studies of proteins at molecular, supramolecular, and cellular levels. **Pure and Applied Chemistry**, v.82, n.1, p.39-55, January 2010.
- QIAN, H.; CHEN, M.Q.; LIN, Z.Y. The effective and specific isolation of antibodies from human serum by using thiophilic paramagnetic polymer beads. **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces**, v.67, n.2, p.224-229, December 2008.
- QIAN, H.; LI, C.J.; LIN, Z.Y.; ZHANG, Y.X. Using thiophilic magnetic beads in purification of antibodies from human serum. Colloids and Surfaces B-Biointerfaces, v.75, n.1, p.342-348, January 2010.
- RIBEIRO, M.B.; VIJAYALAKSHMI, M.; TODOROVA-BALVAY, D.; BUENO, S.M.A. Effect of IDA and TREN chelating agents and buffer systems on the purification of human IgG with immobilized nickel affinity membranes. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, v.861, n.1, p.64-73, January 2008.
- ROBERTS, P.L.; WALKER, C.P.; FELDMAN, P.A. Removal and inactivation of enveloped and non-enveloped viruses during the purification of a high-purity factor IX by metal chelate affinity chromatography. **Vox Sang**, v.67,p.69-71. 1994.
- ROQUE, A.C.A.; SILVA, C.S.O.; TAIPA, M.A. Affinity-based methodologies and ligands for antibody purification: Advances and perspectives. Journal of Chromatography A, v.1160, n.1-2, p.44-55, August 2007.
- ROQUE, A.C.A.; TAIPA, M.A.; LOWE, C.R. An artificial protein L for the purification of immunoglobulins and Fab fragments by affinity chromatography. Journal of Chromatography A, v.1064, n.2, p.157-167, Febuary 2005.
- ROY, I.; GUPTA, M.N. Smart polymeric materials: Emerging biochemical applications. **Chemistry & Biology**, v.10, n.12, p.1161-1171, December 2003.
- SERPA, G.; AUGUSTO, E.F.P.; TAMASHIRO, W.M.S.C.; RIBEIRO, M.B.; MIRANDA, E.A.; BUENO, S.M.A. Evaluation of immobilized metal membrane affinity chromatography for purification of an immunoglobulin G(1) monoclonal antibody. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, v.816, n.1-2, p.259-268. Febuary 2005.
- SERPA, Gisele. Purificação de anticorpos monoclonais anti-TNP do isotipo IgG1 utilizando cromatografia em membranas de afinidade com ions metalicos. 2002. 111 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2002.
- SHARMA, S.; AGARWAL, G.P. Comparative studies on the metal sorption characteristics of chelating gels for immobilized metal ion affinity chromatography.

#### Separation Science and Technology, v.37, n.15, p.3491-3511. 2002.

- SHIROISHI, M.; KOBAYASHI, T.; OGASAWARA, S.; TSUJIMOTO, H.; IKEDA-SUNO, C.; IWATA, S.; SHIMAMURA, T. Production of the stable human histamine H-1 receptor in Pichia pastoris for structural determination. **Methods**, v.55, n.4, p.281-286, December 2011.
- SIGMA ALDRICH. Disponível em: < http://www.sigmaaldrich.com/life-science/corebioreagents/biological-buffers/hepes-specification.html>. Acesso em 14 de Setembro de 2013
- STRAATHOF, A.J.J. The Proportion of Downstream Costs in Fermentative Production Processes. In: MOO-YOUNG, M. **Comprehensive Biotechnology**. Burlington: Academic Press, 2011, p.811-814.
- STURA, E.A.; GRAILLE, M.; HOUSDEN, N.G.; GORE, M.G. Protein L mutants for the crystallization of antibody fragments. Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography, v.58, p.1744-1748, October 2002.
- SULKOWSKI, E. Purification of Proteins by IMAC. **Trends in Biotechnology**, v.3, n.1, p.1-7. 1985.
- SULKOWSKI, E. The Saga of Imac and Mit. **Bioessays**, v.10, n.5, p.170-175, May 1989.
- TAMASHIRO, W.M.S.C; AUGUSTO, E.F.P. Anticorpos monoclonais In: **Tecnologia do Cultivo de Células Animais: de Biofármacos a Terapia Gênica**. 426 ed. São Paulo: Editora Roca Ltda, 2008, v.1, p.1-403.
- TETALA, K.K.R.; SKRZYPEK, K.; LEVISSON, M.; STAMATIALIS, D.F. A metal ion charged mixed matrix membrane for selective adsorption of hemoglobin. **Separation and Purification Technology**, v.115, p.20-26, August 2013.
- TERNYNCK, T.; AVRAMEAS, S. **Techniques Immunoenzymatiques**, França: INSERM, 1987, p. 14-29.
- TODOROVA,D.; VIJAYALAKSHMI, M.A. Immobilized Metal-Ion Affinity Chromatography. In: HAGE, D.S.; CAZES, J. Handbook of Affinity Chromatography. 2.ed. Taylor & Francis Ltd, 2006, p. 257-281.
- TODOROVA-BALVAY, D.; PITIOT, O.; BOURHIM, M.; SRIKRISHNAN, T.; VIJAYALAKSHMI, M. Immobilized metal-ion affinity chromatography of human antibodies and their proteolytic fragments. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, v.808, n.1, p.57-62. August 2004.
- TOWBIN, H.; STAEHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets - Procedure and Some Applications. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.76, n.9, p.4350-4354, 1979.

TURKOVÁ, J. Affinity chromatography. In: VIJAYALAKSHMI, M.A.

Biochromatography. Theory and practice. Taylor and Francis, 2002.

- UEDA, E.K.M.; GOUT, P.W.; MORGANTI, L. Current and prospective applications of metal ion-protein binding. Journal of Chromatography A, v.988, n.1, p.1-23, Febuary 2003.
- UYGUN, D.A.; SENAY, R.H.; TURKCAN, C.; AKGOL, S.; DENIZLI, A. Metal-Chelating Nanopolymers for Antibody Purification from Human Plasma. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.168, n.6, p.1528-1539, November 2012.
- VANÇAN, S.; MIRANDA, E. A. BUENO, S. M. A. IMAC of human IgG: studies with IDAimmobilized copper, nickel, zinc, and cobalt ions and different buffer systems. Process Biochemistry, v.37, n.6, p.573-579, January 2002.
- VIJAYALAKSHMI, M. A. Pseudobiospecific Ligand Affinity-Chromatography. **Trends in Biotechnology**, v.7, n.3, p.71-76, March 1989.
- WANG, D.D.; SU, M.M.; SUN, Y.; HUANG, S.L.; WANG, J.; YAN, W.Q. Expression, purification and characterization of a human single-chain Fv antibody fragment fused with the Fc of an IgG1 targeting a rabies antigen in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v.86, n.1, p.75-81, November 2012.
- WEISSER, N.E.; HALL, J.C. Applications of single-chain variable fragment antibodies in therapeutics and diagnostics. Biotechnology Advances, v.27, n.4, p.502-520, August 2009.
- WESTERMEIER, R. Protein elution and blotting techniques. In: Jason, J. Protein Purification: Principles, High Resolution Methods, and Applications. 3.ed. John Wiley & Sons, Inc.; 2011, p. 441-450.
- WINICHAYAKUL, S.; PERNTHANER, A.; LIVINGSTON, S.; COOKSON, R.; SCOTT, R.; ROBERTS, N. Production of active single-chain antibodies in seeds using trimeric polyoleosin fusion. Journal of Biotechnology, v.161, n.4, p.407-413, November 2012.
- WONG, J., ALBRIGTH, R.L; WANGN N.H.W. Immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC) chemistry and bioseparation applications. **Separation** and Purification Methods, v.20, n.1, p.49-106, January 1991.
- WU, W.Y.; MILLER, K.D.; COOLBAUGH, M.; WOOD, D.W. Intein-mediated one-step purification of Escherichia coli secreted human antibody fragments. Protein Expression and Purification, v.76, n.2, p.221-228, April 2011.
- XIANG, H.; WYNN, R.; NGUYEN, L.H.T.; ROSS, O.H.; AHRENS, D.P.; O'NEILL, K.T.; HOLLIS, G.F.; PATRICK, D.R. Immobilized metal-ion affinity chromatography of recombinant Fab protein OPG C11 in the presence of EDTA-Mg(II). Journal of Chromatography A, v.978, n.1-2, p.153-164, November 2002.
- YANG, H.; GURGEL, P.V.; CARBONELL, R.G. Purification of human immunoglobulin G via Fc-specific small peptide ligand affinity chromatography. Journal of Chromatography A, v.1216, n.6, p.910-918, February 2009.

YAVUZ, H.; BERELI, N.; ARMUTCU, C.; YILMAZ, F.; DENIZLI, A. Antibody Purification

from Human Plasma by Metal-Chelated Affinity Membranes. **Journal of Applied Polymer Science**, v.123, n.6, p.3476-3484, March 2012.

- YU, D.Q.; GHOSH, R. Integrated Fragmentation of Human IgG and Purification of Fab Using a Reactant Adsorptive Membrane Bioreactor Separator System. **Biotechnology and Bioengineering**, v.104, n.1, p.152-161, September 2009.
- YU, D.Q.; GHOSH, R. Membrane bioreactor separator system for integrated IgG fragmentation and Fab purification. **Journal of Immunological Methods**, v.359, n.1-2, p.37-41, July 2010.
- YU, Sean X. Antibody Reagent Market A short review of market share and fastgrowing antibody companie. **BioAstrum**. 09 Abril. 2012. Disponível em < http://www.bioastrum.com/home/sites/docs/Antibody-reagent-market-2012.pdf >. Acesso em Junho de 2013.
- ZACHARIOU, M.; HEARN, M.T.W. Application of immobilized metal ion chelate complexes as pseudocation exchange adsorbents for protein separation. **Biochemistry**, v.35, n.1, p.202-211, January 1996.
- ZHAO, Q.; CHAN, Y.W.; LEE, S.S.T.; CHEUNG, W.T. One-step expression and purification of single-chain variable antibody fragment using an improved hexahistidine tag phagemid vector. **Protein Expression and Purification**, v.68, n.2, p.190-195. December 2009a.
- ZHAO, Y.H.; GUTSHALL, L.; JIANG, H.Y.; BAKER, A.; BEIL, E.; OBMOLOVA, G.; CARTON, J.; TAUDTE, S.; AMEGADZIE, B. Two routes for production and purification of Fab fragments in biopharmaceutical discovery research: Papain digestion of mAb and transient expression in mammalian cells. **Protein Expression and Purification**, v.67, n.2, p.182-189, October 2009b.
- ZIMMERMAN, T.; FRERE, C.P.; SATZGER, M.; RABA, M.; WEISBACH, M.; DOHN, K.; POPP, A.; DONZEAU, M. Simultaneous metal chelate affinity purification and endotoxin clearance of recombinant antibody fragments. Journal of Immunological Methods, v.314, n.1-2, p.67-73, July 2006.

# **APÊNDICE A**

kDa 150 lgG 97 66 Fc 45 30 Fab Fragmentos 20,1 clivados 14,4 Μ lgG А А А А А А А

Perfil eletroforético das soluções de injeção empregadas nos experimentos e obtidas da clivagem enzimática de IgG humana

**Figura A:** Gel de eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras: M – Marcador de baixa massa molecular; IgG – Marcador de IgG; A – Solução de injeção

#### **APÊNDICE B**

Cromatogramas, eletroforeses e balanços de massas, em duplicata, dos experimentos realizados com os ligantes CM-Asp-Ni(II), empregando os tampões de adsorção Hepes, Tris-HCI e fosfato de sódio todos a 25 mmol/L, pH 7,5 na ausência e presença de na presença de NaCI (1,0 mol/L), pH 7,5 e de eluição por adição de imidazol (100 mmol/L). Os resultados apresentados neste apêndice são referentes aos apresentados no item 4.1



**Figura B-1:** Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) de adsorção de fragmentos de IgG a partir de solução contendo fragmentos Fab e Fc em coluna contendo gel agarose-CM-Asp-Ni(II) utilizando sistema tamponante Hepes na ausência de NaCl em pH 7,5. Leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. I: Injeção de 1,0 mL de solução contendo fragmentos Fab e Fc de IgG humana na concentração de 3,89 mg/mL. L: Lavagem com tampão Hepes, pH 7,5. E: Eluição com tampão Hepes contendo 100,0 mmol/L de imidazol, pH 7,5. R: Regeneração com EDTA 100 mmol/L, pH 7,0. Gel de eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras: M – Marcador de baixa massa molecular; IgG – Marcador de IgG; A – Solução de injeção; L – Lavagem; E – Eluição.



**Figura B-2:** Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) de adsorção de fragmentos de IgG a partir de solução contendo fragmentos Fab e Fc em coluna contendo gel agarose-CM-Asp-Ni(II) utilizando sistema tamponante Hepes, na ausência de NaCI em pH 7,5. Leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. I: Injeção de 1,0 mL de solução contendo fragmentos Fab e Fc de IgG humana na concentração de 3,89 mg/mL. L: Lavagem com tampão Hepes, pH 7,5. E: Eluição com tampão Hepes ,contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5. R: Regeneração com EDTA 100 mmol/L, pH 7,0. Gel de eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras: M – Marcador de baixa massa molecular; IgG – Marcador de IgG; A – Solu de injeção; L – Lavagem; E – Eluição.

**Tabela B-1:** Balanço de massa da cromatografia em gel de agarose-CM-Asp-Ni(II) utilizando tampão de equilíbrio e lavagem Hepes, pH 7,5; eluição: Hepes, contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5 e regeneração: EDTA 100 mmol/L, pH 7,0.

Frações	PT <sup>a</sup> (mg)	% <sup>b</sup>
Injeção	$3,89 \pm 0,08$	100,00
Lavagem	1,33 ± 0,08	34,18
Eluição	2,62 ± 0,14	67,22
Regeneração	$0,12 \pm 0,02$	3,05
Recuperação	$4,07 \pm 0,08$	104,44
Proteínas totais adsorvidas (mg)	2,74 ± 0,16	-
Proteínas totais adsorvidas(mg/mL)	0,91 ± 0,05	-

<sup>a</sup> Proteína Total: Média da Massa calculada por meio da dosagem de proteínas totais (método de Bradford, 1976)

<sup>b</sup> Massa de fragmentos de IgG em cada etapa dividida pela massa de fragmentos de IgG inicial no processo x 100



**Figura B-3:** Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) de adsorção de fragmentos de IgG a partir de solução contendo fragmentos Fab e Fc em coluna contendo gel agarose-CM-Asp-Ni(II) utilizando sistema tamponante Hepes, na presença de NaCl 1 mol/L, em pH 7,5. Leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. I: Injeção de 1,0 mL de solução contendo fragmentos Fab e Fc de IgG humana na concentração de 3,66 mg/mL. L: Lavagem com tampão Hepes, na presença de NaCl 1 mol/L, pH 7,5. E: Eluição com tampão Hepes, na presença de NaCl 1 mol/L, contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5. R: Regeneração com EDTA 100 mmol/L, pH 7,0. Gel de eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras: M – Marcador de baixa massa molecular; IgG – Marcador de IgG; A – Solução de injeção; L – Lavagem; E – Eluição.



**Figura B-4:** Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) de adsorção de fragmentos de IgG a partir de solução contendo fragmentos Fab e Fc em coluna contendo gel agarose-CM-Asp-Ni(II) utilizando sistema tamponante Hepes, na presença de NaCl 1 mol/L, em pH 7,5. Leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. I: Injeção de 1,0 mL de solução contendo fragmentos Fab e Fc de IgG humana na concentração de 3,73 mg/mL. L: Lavagem com tampão Hepes, na presença de NaCl 1 mol/L, pH 7,5. E: Eluição com tampão Hepes, na presença de NaCl 1 mol/L, contendo 100mmol/L de imidazol, pH 7,5. R: Regeneração com EDTA 100 mmol/L, pH 7,0. Gel de eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras: M – Marcador de baixa massa molecular; IgG – Marcador de IgG; A – Solução de injeção; L – Lavagem; E – Eluição.

**Tabela B-2:** Balanço de massa da cromatografia em gel de agarose-CM-Asp-Ni(II) utilizando tampão de equilíbrio e lavagem Hepes, na presença de NaCl 1 mol/L pH 7,5; eluição: Hepes, na presença de NaCl 1 mol/L, contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5 e regeneração: EDTA 100 mmol/L, pH 7,0.

Frações	PT <sup>a</sup> (mg)	% <sup>b</sup>
Injeção	$3,70 \pm 0,05$	100,00
Lavagem	$2,28 \pm 0,02$	61,75
Eluição	$1,54 \pm 0,08$	41,61
Regeneração	0,00	0,00
Recuperação	3,82 ± 0,10	103,39
Proteínas totais adsorvidas (mg)	$1,54 \pm 0,08$	-
Proteínas totais adsorvidas(mg/mL)	0,51 ± 0,02	-

<sup>a</sup> Proteína Total: Média da Massa calculada por meio da dosagem de proteínas totais (método de Bradford, 1976)

<sup>b</sup> Massa de fragmentos de IgG em cada etapa dividida pela massa de fragmentos de IgG inicial no processo x 100



**Figura B-5:** Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) de adsorção de fragmentos de IgG a partir de solução contendo fragmentos Fab e Fc em coluna contendo gel agarose-CM-Asp-Ni(II) utilizando sistema tamponante Tris-HCI, em pH 7,5. Leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. I: Injeção de 1,0 mL de solução contendo fragmentos Fab e Fc de IgG humana na concentração de 3,49 mg/mL. L: Lavagem com tampão Tris-HCI, pH 7,5. E: Eluição com tampão Tris-HCI, contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5. R: Regeneração com EDTA 100 mmol/L, pH 7,0. Gel de eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras: M – Marcador de baixa massa molecular; IgG – Marcador de IgG; A – Solução de injeção; L – Lavagem; E – Eluição.



**Figura B-6:** Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) de adsorção de fragmentos de IgG a partir de solução contendo fragmentos Fab e Fc em coluna contendo gel agarose-CM-Asp-Ni(II) utilizando sistema tamponante Tris-HCI, em pH 7,5. Leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. I: Injeção de 1,0 mL de solução contendo fragmentos Fab e Fc de IgG humana na concentração de 3,45 mg/mL. L: Lavagem com tampão Tris-HCI, pH 7,5. E: Eluição com tampão Tris-HCI, contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5. R: Regeneração com EDTA 100 mmol/L, pH 7,0. Gel de eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras: M – Marcador de baixa massa molecular; IgG – Marcador de IgG; A – Solução de injeção; L – Lavagem; E – Eluição.

Tabela	B-3: Balanço	) de massa	da croma	atografia	em gel	de agaros	se-CM-Asp	-Ni(II)	utilizan	Ido
tampão	de equilíbrio	e lavagem	Tris-HCI,	pH 7,5;	eluição	: Tris-HCl,	contendo	100 n	nmol/L	de
imidazo	ol, pH 7,5 e reg	generação: l	EDTA 100	) mmol/L	, pH 7,0.					

Frações	PT <sup>a</sup> (mg)	% <sup>b</sup>
Injeção	3,47 ± 0,02	100,00
Lavagem	1,95 ± 0,11	56,05
Eluição	1,47 <u>+</u> 0,06	42,22
Regeneração	0,02 ± 0,00	0,43
Recuperação	3,43 <u>+</u> 0,05	98,70
Proteínas totais adsorvidas (mg)	1,48 ± 0,06	-
Proteínas totais adsorvidas (mg/mL)	0,49 ± 0,02	-

<sup>a</sup> Proteína Total: Média da Massa calculada por meio da dosagem de proteínas totais (método de

Bradford, 1976) <sup>b</sup> Massa de fragmentos de IgG em cada etapa dividida pela massa de fragmentos de IgG inicial no processo x 100



**Figura B-7:** Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) de adsorção de fragmentos de IgG a partir de solução contendo fragmentos Fab e Fc em coluna contendo gel agarose-CM-Asp-Ni(II) utilizando sistema tamponante Tris-HCI, na presença de NaCl 1 mol/L, em pH 7,5. Leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. I: Injeção de 1,0 mL de solução contendo fragmentos Fab e Fc de IgG humana na concentração de 3,53 mg/mL. L: Lavagem com tampão Tris-HCI, na presença de NaCl 1 mol/L, pH 7,5. E: Eluição com tampão Tris-HCI, na presença de NaCl 1 mol/L, contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5. R: Regeneração com EDTA 100 mmol/L, pH 7,0. Gel de eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras: M – Marcador de baixa massa molecular; IgG – Marcador de IgG; A – Solução de injeção; L – Lavagem; E – Eluição.



**Figura B-8:** Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) de adsorção de fragmentos de IgG a partir de solução contendo fragmentos Fab e Fc em coluna contendo gel agarose-CM-Asp-Ni(II) utilizando sistema tamponante Tris-HCI, na presença de NaCl 1 mol/L, em pH 7,5. Leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. I: Injeção de 1,0 mL de solução contendo fragmentos Fab e Fc de IgG humana na concentração de 3,55 mg/mL. L: Lavagem com tampão Tris-HCI, na presença de NaCl 1 mol/L, pH 7,5. E: Eluição com tampão Tris-HCI, na presença de NaCl 1 mol/L, contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5. R: Regeneração com EDTA 100 mmol/L, pH 7,0. Gel de eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras: M – Marcador de baixa massa molecular; IgG – Marcador de IgG; A – Solução de injeção; L – Lavagem; E – Eluição.

**Tabela B-4:** Balanço de massa da cromatografia em gel de agarose-CM-Asp-Ni(II) utilizando tampão de equilíbrio e lavagem Tris-HCl, na presença de NaCl 1 mol/L, pH 7,5; eluição: Tris-HCl, na presença de NaCl 1 mol/L, contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5 e regeneração: EDTA 100 mmol/L, pH 7,0.

Frações	PT <sup>a</sup> (mg)	% <sup>b</sup>
Injeção	3,54 ± 0,01	100,00
Lavagem	2,61±0,02	73,59
Eluição	1,06 ± 0,01	29,80
Regeneração	$0,00\pm0,00$	0,00
Recuperação	3,66 ± 0,02	103,39
Proteínas totais adsorvidas (mg)	1,06 ± 0,01	-
Proteínas totais adsorvidas(mg/mL)	0,35 ± 0,00	-

<sup>a</sup> Proteína Total: Média da Massa calculada por meio da dosagem de proteínas totais (método de Bradford, 1976)
<sup>b</sup> Massa de fragmentos de IgG em cada etapa dividida pela massa de fragmentos de IgG inicial no

<sup>o</sup> Massa de fragmentos de IgG em cada etapa dividida pela massa de fragmentos de IgG inicial no processo x 100


**Figura B-9:** Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) de adsorção de fragmentos de IgG a partir de solução contendo fragmentos Fab e Fc em coluna contendo gel agarose-CM-Asp-Ni(II) utilizando sistema tamponante fosfato de sódio, em pH 7,5. Leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. I: Injeção de 1,0 mL de solução contendo fragmentos Fab e Fc de IgG humana na concentração de 3,64 mg/mL. L: Lavagem com tampão fosfato de sódio, pH 7,5. E: Eluição com tampão fosfato de sódio, contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5. R: Regeneração com EDTA 100 mmol/L, pH 7,0. Gel de eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras: M – Marcador de baixa massa molecular; IgG – Marcador de IgG; A – Solução de injeção; L – Lavagem; E – Eluição.



**Figura B-10:** Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) de adsorção de fragmentos de IgG a partir de solução contendo fragmentos Fab e Fc em coluna contendo gel agarose-CM-Asp-Ni(II) utilizando sistema tamponante fosfato de sódio, em pH 7,5. Leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. I: Injeção de 1,0 mL de solução contendo fragmentos Fab e Fc de IgG humana na concentração de 3,43 mg/mL. L: Lavagem com tampão fosfato de sódio, pH 7,5. E: Eluição com tampão fosfato de sódio, contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5. R: Regeneração com EDTA 100 mmol/L, pH 7,0. Gel de eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras: M – Marcador de baixa massa molecular; IgG – Marcador de IgG; A – Solução de injeção; L – Lavagem; E – Eluição.

**Tabela B-5:** Balanço de massa da cromatografia em gel de agarose-CM-Asp-Ni(II) utilizando tampão de equilíbrio e lavagem fosfato de sódio, pH 7,5; eluição: fosfato de sódio, contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5 e regeneração: EDTA 100 mmol/L, pH 7,0.

Frações	PT <sup>a</sup> (mg)	% <sup>b</sup>
Injeção	3,53 ± 0,10	100,00
Lavagem	$2,\!32\pm0,\!06$	65,60
Eluição	1,09 ± 0,13	30,79
Regeneração	0,01 ± 0,01	0,24
Recuperação	3,41 ± 0,20	96,64
Proteínas totais adsorvidas (mg)	1,10 ± 0,14	-
Proteínas totais adsorvidas(mg/mL)	0,37 ± 0,05	-

<sup>b</sup> Massa de fragmentos de IgG em cada etapa dividida pela massa de fragmentos de IgG inicial no processo x 100



**Figura B-11:** Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) de adsorção de fragmentos de IgG a partir de solução contendo fragmentos Fab e Fc em coluna contendo gel agarose-CM-Asp-Ni(II) utilizando sistema tamponante fosfato de sódio, na presença de NaCl 1 mol/L, em pH 7,5. Leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. I: Injeção de 1,0 mL de solução contendo fragmentos Fab e Fc de IgG humana na concentração de 3,83 mg/mL. L: Lavagem com tampão fosfato de sódio, na presença de NaCl 1 mol/L, pH 7,5. E: Eluição com tampão fosfato de sódio, na presença de NaCl 1 mol/L, pH 7,5. E: Eluição com tampão fosfato de sódio, na presença de NaCl 1 mol/L, pH 7,5. E: Eluição com tampão fosfato de sódio, na presença de NaCl 1 mol/L, contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5. R: Regeneração com EDTA 100 mmol/L, pH 7,0. Gel de eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras: M – Marcador de baixa massa molecular; IgG – Marcador de IgG; A – Solução de injeção; L – Lavagem; E – Eluição.



**Figura B-12:** Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) de adsorção de fragmentos de IgG a partir de solução contendo fragmentos Fab e Fc em coluna contendo gel agarose-CM-Asp-Ni(II) utilizando sistema tamponante fosfato de sódio, na presença de NaCl 1 mol/L, em pH 7,5. Leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. I: Injeção de 1,0 mL de solução contendo fragmentos Fab e Fc de IgG humana na concentração de 3,68 mg/mL. L: Lavagem com tampão fosfato de sódio, na presença de NaCl 1 mol/L, pH 7,5. E: Eluição com tampão fosfato de sódio, na presença de NaCl 1 mol/L, pH 7,5. E: Eluição com tampão fosfato de sódio, na presença de NaCl 1 mol/L, pH 7,5. E: Eluição com tampão fosfato de sódio, na presença de NaCl 1 mol/L, contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5. R: Regeneração com EDTA 100 mmol/L, pH 7,0. Gel de eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras: M – Marcador de baixa massa molecular; IgG – Marcador de IgG; A – Solução de injeção; L – Lavagem; E – Eluição.

Tabela B-6: Balanço de massa da cromatografia em gel de agarose-CM-Asp-Ni(II) utilizando tampão de equilíbrio e lavagem fosfato de sódio, na presença de NaCl 1 mol/L, pH 7,5; eluição: fosfato de sódio, na presença de NaCl 1 mol/L, contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5 e regeneração: EDTA 100 mmol/L, pH 7,0.

Frações	PT <sup>a</sup> (mg)	% <sup>b</sup>
Injeção	3,76 ± 0,08	100,00
Lavagem	2,48 ± 0,20	66,05
Eluição	1,33 ± 0,05	35,29
Regeneração	$0,00\pm0,00$	0,00
Recuperação	3,79 ± 0,25	100,93
Proteínas totais adsorvidas (mg)	1,32 ± 0,06	-
Proteínas totais adsorvidas(mg/mL)	0,44 ± 0,02	-

<sup>a</sup> Proteína Total: Média da Massa calculada por meio da dosagem de proteínas totais (método de Bradford, 1976) <sup>b</sup> Massa de fragmentos de IgG em cada etapa dividida pela massa de fragmentos de IgG inicial no

processo x 100



**Figura B-13:** (a) Início da curva de ruptura no gel agarose-CM-Asp-Ni(II) em tampão Hepes, com NaCl (1,0 mol/L), em pH 7,5. Leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/L. I: Injeção de 33,0 mL de solução de digestão (Fab e Fc de IgG humana) na concentração de 0,97 mg/mL. (b) L: Lavagem tampão Hepes, com NaCl (1,0 mol/L), pH 7,5. E: Eluição tampão Hepes, com NaCl (1,0 mol/L), contendo 100,0 mmol/L de imidazol, pH 7,5. R: Regeneração com EDTA 100 mmol/L, pH 7,0.

**Tabela B-7:** Balanço de massa da curva de ruptura em gel de agarose-CM-Asp-Ni(II) utilizando tampão de equilíbrio e lavagem Hepes, na presença de NaCl 1 mol/L, pH 7,5; eluição: fosfato de sódio, na presença de NaCl 1 mol/L, contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5 e regeneração: EDTA 100 mmol/L, pH 7,0.

Frações	PT <sup>a</sup> (mg)	% <sup>b</sup>
Injeção	30,57 ± 0,63	100,00
Flowthrough	3,97 ± 0,01	12,97
Lavagem	27,51 ± 0,53	90,01
Eluição	2,47 ± 0,12	8,07
Regeneração	$0,00\pm0,00$	0,00
Recuperação	29,98 ± 0,65	98,09
Proteínas totais adsorvidas (mg)	2,47 ± 0,12	-
Proteínas totais adsorvidas(mg/mL)	0,82 ± 0,04	-

<sup>b</sup> Massa de fragmentos de IgG em cada etapa dividida pela massa de fragmentos de IgG inicial no processo x 100

## **APÊNDICE C**

Cromatogramas, eletroforeses e balanços de massas, em duplicata, dos experimentos realizados com os ligantes CM-Asp-Cu(II), empregando os tampões de adsorção Hepes, Tris-HCI e fosfato de sódio todos a 25 mmol/L, pH 7,5 na ausência e presença de na presença de NaCI (1 mol/L), pH 7,5 e de eluição por adição de imidazol (100 mmol/L). Os resultados apresentados neste apêndice são referentes aos apresentados no item 4.1



**Figura C-1:** Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) de adsorção de fragmentos de IgG a partir de solução contendo fragmentos Fab e Fc em coluna contendo gel agarose-CM-Asp-Cu(II) utilizando sistema tamponante Hepes, na ausência de NaCl, em pH 7,5. Leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. I: Injeção de 1,0 mL de solução contendo fragmentos Fab e Fc de IgG humana na concentração de 3,56 mg/mL. L: Lavagem com tampão Hepes, na ausência de NaCl, pH 7,5. E: Eluição com tampão Hepes, na ausência de NaCl, contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5. R: Regeneração com EDTA 100 mmol/L, pH 7,0. Gel de eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras: M – Marcador de baixa massa molecular; IgG – Marcador de IgG; A – Solução de injeção; L – Lavagem; E – Eluição.



**Figura C-2:** Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) de adsorção de fragmentos de IgG a partir de solução contendo fragmentos Fab e Fc em coluna contendo gel agarose-CM-Asp-Co(II) utilizando sistema tamponante Hepes, na ausência de NaCI, em pH 7,5. Leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. I: Injeção de 1,0 mL de solução contendo fragmentos Fab e Fc de IgG humana na concentração de 3,64 mg/mL. L: Lavagem com tampão Hepes, na ausência de NaCI, pH 7,5. E: Eluição com tampão Hepes, na ausência de NaCI, contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5. R: Regeneração com EDTA 100 mmol/L, pH 7,0. Gel de eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras: M – Marcador de baixa massa molecular; IgG – Marcador de IgG; A – Solução de injeção; L – Lavagem; E – Eluição.

**Tabela C-1:** Balanço de massa da cromatografia em gel de agarose-CM-Asp-Cu(II) utilizando tampão de equilíbrio e lavagem Hepes, pH 7,5; eluição: Hepes contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5 e regeneração: EDTA 100 mmol/L, pH 7,0.

Frações	PT <sup>a</sup> (mg)	% <sup>b</sup>
Injeção	$3,60 \pm 0,06$	100,00
Lavagem	0,15 ± 0,07	4,12
Eluição	3,33 ± 0,13	92,49
Regeneração	$0,07\pm 0,00$	2,08
Recuperação	$3,55 \pm 0,06$	98,69
Proteínas totais adsorvidas (mg)	3,40 ± 0,13	-
Proteínas totais adsorvidas(mg/mL)	1,15 ± 0,04	-

<sup>b</sup> Massa de fragmentos de IgG em cada etapa dividida pela massa de fragmentos de IgG inicial no processo x 100



**Figura C-3:** Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) de adsorção de fragmentos de IgG a partir de solução contendo fragmentos Fab e Fc em coluna contendo gel agarose-CM-Asp-Cu (II) utilizando sistema tamponante Hepes, na presença de NaCl 1 mol/L, em pH 7,5. Leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. I: Injeção de 1,0 mL de solução contendo fragmentos Fab e Fc de IgG humana na concentração de 3,67 mg/mL. L: Lavagem com tampão Hepes, na presença de NaCl 1 mol/L, pH 7,5. E: Eluição com tampão Hepes, na presença de NaCl 1 mol/L, contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5. R: Regeneração com EDTA 100 mmol/L, pH 7,0. Gel de eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras: M – Marcador de baixa massa molecular; IgG – Marcador de IgG; A – Solução de injeção; L – Lavagem; E – Eluição.



**Figura C-4:** Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) de adsorção de fragmentos de IgG a partir de solução contendo fragmentos Fab e Fc em coluna contendo gel agarose-CM-Asp-Cu (II) utilizando sistema tamponante Hepes, na presença de NaCl 1 mol/L, em pH 7,5. Leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. I: Injeção de 1,0 mL de solução contendo fragmentos Fab e Fc de IgG humana na concentração de 3,46 mg/mL. L: Lavagem com tampão Hepes, na presença de NaCl 1 mol/L, pH 7,5. E: Eluição com tampão Hepes, na presença de NaCl 1 mol/L, contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5. R: Regeneração com EDTA 100 mmol/L, pH 7,0. Gel de eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras: M – Marcador de baixa massa molecular; IgG – Marcador de IgG; A – Solução de injeção; L – Lavagem; E – Eluição.

**Tabela C-2:** Balanço de massa da cromatografia em gel de agarose-CM-Asp-Cu(II) utilizando tampão de equilíbrio e lavagem Hepes, na presença de NaCl 1 mol/L, pH 7,5; eluição: Hepes, na presença de NaCl 1 mol/L, contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5 e regeneração: EDTA 100 mmol/L, pH 7,0.

Frações	PT <sup>a</sup> (mg)	% <sup>b</sup>
Injeção	$3,57 \pm 0,14$	100,00
Lavagem	$1,00 \pm 0,02$	27,91
Eluição	$2,63 \pm 0,14$	73,69
Regeneração	0,01 ± 0,00	0,39
Recuperação	$3,64 \pm 0,12$	101,99
Proteínas totais adsorvidas (mg)	$2,64 \pm 0,14$	-
Proteínas totais adsorvidas(mg/mL)	0,88 ± 0,05	-

<sup>a</sup> Proteína Total: Média da Massa calculada por meio da dosagem de proteínas totais (método de Bradford, 1976)
<sup>b</sup> Massa de fragmentos de IgG em cada etapa dividida pela massa de fragmentos de IgG inicial no

<sup>o</sup> Massa de fragmentos de IgG em cada etapa dividida pela massa de fragmentos de IgG inicial no processo x 100



**Figura C-5:** Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) de adsorção de fragmentos de IgG a partir de solução contendo fragmentos Fab e Fc em coluna contendo gel agarose-CM-Asp-Cu (II) utilizando sistema tamponante Tris-HCI, em pH 7,5. Leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. I: Injeção de 1,0 mL de solução contendo fragmentos Fab e Fc de IgG humana na concentração de 3,37 mg/mL. L: Lavagem com tampão Tris-HCI, pH 7,5. E: Eluição com tampão Tris-HCI, contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5. R: Regeneração com EDTA 100 mmol/L, pH 7,0. Gel de eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras: M – Marcador de baixa massa molecular; IgG – Marcador de IgG; A – Solução de injeção; L – Lavagem; E – Eluição.



**Figura C-6:** Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) de adsorção de fragmentos de IgG a partir de solução contendo fragmentos Fab e Fc em coluna contendo gel agarose-CM-Asp-Cu (II) utilizando sistema tamponante Tris-HCI, em pH 7,5. Leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. I: Injeção de 1,0 mL de solução contendo fragmentos Fab e Fc de IgG humana na concentração de 3,37 mg/mL. L: Lavagem com tampão Tris-HCI, pH 7,5. E: Eluição com tampão Tris-HCI, contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5. R: Regeneração com EDTA 100 mmol/L, pH 7,0. Gel de eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras: M – Marcador de baixa massa molecular; IgG – Marcador de IgG; A – Solução de injeção; L – Lavagem; E – Eluição.

**Tabela C-3:** Balanço de massa da cromatografia em gel de agarose-CM-Asp-Cu(II) utilizando tampão de equilíbrio e lavagem Tris-HCI, pH 7,5; eluição: Tris-HCI contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5 e regeneração: EDTA 100 mmol/L, pH 7,0.

Frações	PT <sup>a</sup> (mg)	% <sup>b</sup>
Injeção	3,41 ± 0,06	100,00
Lavagem	$0,30 \pm 0,04$	8,92
Eluição	2,97 ± 0,17	86,98
Regeneração	0,01 ± 0,01	0,38
Recuperação	3,28 ± 0,31	96,28
Proteínas totais adsorvidas (mg)	2,98 ± 0,18	-
Proteínas totais adsorvidas (mg/mL)	0,99 ± 0,06	-

<sup>b</sup> Massa de fragmentos de IgG em cada etapa dividida pela massa de fragmentos de IgG inicial no processo x 100



**Figura C-7:** Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) de adsorção de fragmentos de IgG a partir de solução contendo fragmentos Fab e Fc em coluna contendo gel agarose-CM-Asp-Cu (II) utilizando sistema tamponante Tris-HCl, na presença de NaCl (1 mol/L), em pH 7,5. Leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. I: Injeção de 1,0 mL de solução contendo fragmentos Fab e Fc de IgG humana na concentração de 3,49 mg/mL. L: Lavagem com tampão Tris-HCl, na presença de NaCl (1 mol/L), pH 7,5. E: Eluição com tampão Tris-HCl, na presença de NaCl (1 mol/L), contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5. R: Regeneração com EDTA 100 mmol/L, pH 7,0. Gel de eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras: M – Marcador de baixa massa molecular; IgG – Marcador de IgG; A – Solução de injeção; L – Lavagem; E – Eluição.



**Figura C-8:** Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) de adsorção de fragmentos de IgG a partir de solução contendo fragmentos Fab e Fc em coluna contendo gel agarose-CM-Asp-Cu (II) utilizando sistema tamponante Tris-HCl, na presença de NaCl (1 mol/L), em pH 7,5. Leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. I: Injeção de 1,0 mL de solução contendo fragmentos Fab e Fc de IgG humana na concentração de 3,49 mg/mL. L: Lavagem com tampão Tris-HCl, na presença de NaCl (1 mol/L), pH 7,5. E: Eluição com tampão Tris-HCl, na presença de NaCl (1 mol/L), contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5. R: Regeneração com EDTA 100 mmol/L, pH 7,0. Gel de eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras: M – Marcador de baixa massa molecular; IgG – Marcador de IgG; A – Solução de injeção; L – Lavagem; E – Eluição

**Tabela C-4:** Balanço de massa da cromatografia em gel de agarose-CM-Asp-Cu(II) utilizando tampão de equilíbrio e lavagem Tris-HCl, na presença de NaCl (1 mol/L), pH 7,5; eluição: Tris-HCl, na presença de NaCl (1 mol/L), contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5 e regeneração: EDTA 100 mmol/L, pH 7,0.

Frações	PT <sup>a</sup> (mg)	% <sup>b</sup>
Injeção	$3,55 \pm 0,09$	100,00
Lavagem	$1,33 \pm 0,09$	37,59
Eluição	$2,2 \pm 0,18$	62,26
Regeneração	$0,00 \pm 0,06$	0,00
Recuperação	$3,54 \pm 0,27$	99,85
Proteínas totais adsorvidas (mg)	2,21 ± 0,18	-
Proteínas totais adsorvidas (mg/mL)	$0,74 \pm 0,06$	-

<sup>a</sup> Proteína Total: Média da Massa calculada por meio da dosagem de proteínas totais (método de Bradford, 1976)

<sup>b</sup> Massa de fragmentos de IgG em cada etapa dividida pela massa de fragmentos de IgG inicial no processo x 100



**Figura C-9:** Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) de adsorção de fragmentos de IgG a partir de solução contendo fragmentos Fab e Fc em coluna contendo gel agarose-CM-Asp-Cu (II) utilizando sistema tamponante fosfato de sódio, em pH 7,5. Leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. I: Injeção de 1,0 mL de solução contendo fragmentos Fab e Fc de IgG humana na concentração de 3,38 mg/mL. L: Lavagem com tampão fosfato de sódio, pH 7,5. E: Eluição com tampão fosfato de sódio, contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5. R: Regeneração com EDTA 100 mmol/L, pH 7,0. Gel de eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras: M – Marcador de baixa massa molecular; IgG – Marcador de IgG; A – Solução de injeção; L – Lavagem; E – Eluição.



**Figura C-10:** Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) de adsorção de fragmentos de IgG a partir de solução contendo fragmentos Fab e Fc em coluna contendo gel agarose-CM-Asp-Cu (II) utilizando sistema tamponante fosfato de sódio, em pH 7,5. Leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. I: Injeção de 1,0 mL de solução contendo fragmentos Fab e Fc de IgG humana na concentração de 3,57 mg/mL. L: Lavagem com tampão fosfato de sódio, pH 7,5. E: Eluição com tampão fosfato de sódio; L, contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5. R: Regeneração com EDTA 100 mmol/L, pH 7,0. Gel de eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras: M – Marcador de baixa massa molecular; IgG – Marcador de IgG; A – Solução de injeção; L – Lavagem; E – Eluição.

**Tabela C-5:** Balanço de massa da cromatografia em gel de agarose-CM-Asp-Cu(II) utilizando tampão de equilíbrio e lavagem fosfato de sódio, pH 7,5; eluição: fosfato de sódio contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5 e regeneração: EDTA 100 mmol/L, pH 7,0.

Frações	PT <sup>a</sup> (mg)	% <sup>b</sup>
Injeção	3,48 ± 0,10	100,00
Lavagem	0,16 ± 0,01	4,46
Eluição	$3,36 \pm 0,03$	96,69
Regeneração	$0,00 \pm 0,00$	0,00
Recuperação	$3,52 \pm 0,04$	101,15
Proteínas totais adsorvidas (mg)	3,36 ± 0,03	-
Proteínas totais adsorvidas (mg/mL)	1,12 ± 0,01	-

<sup>b</sup> Massa de fragmentos de IgG em cada etapa dividida pela massa de fragmentos de IgG inicial no processo x 100



**Figura C-11:** Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) de adsorção de fragmentos de IgG a partir de solução contendo fragmentos Fab e Fc em coluna contendo gel agarose-CM-Asp-Cu (II) utilizando sistema tamponante fosfato de sódio, na presença de NaCl (1 mol/L), em pH 7,5. Leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. I: Injeção de 1,0 mL de solução contendo fragmentos Fab e Fc de IgG humana na concentração de 3,33 mg/mL. L: Lavagem com tampão fosfato de sódio 25 mmol/L, na presença de NaCl (1 mol/L), pH 7,5. E: Eluição com tampão fosfato de sódio 25 mmol/L, na presença de NaCl (1 mol/L), contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5. R: Regeneração com EDTA 100 mmol/L, pH 7,0. Gel de eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras: M – Marcador de baixa massa molecular; IgG – Marcador de IgG; A – Solução de injeção; L – Lavagem; E – Eluição



**Figura C-12:** Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) de adsorção de fragmentos de IgG a partir de solução contendo fragmentos Fab e Fc em coluna contendo gel agarose-CM-Asp-Cu (II) utilizando sistema tamponante fosfato de sódio, na presença de NaCl (1 mol/L), em pH 7,5. Leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. I: Injeção de 1,0 mL de solução contendo fragmentos Fab e Fc de IgG humana na concentração de 3,65 mg/mL. L: Lavagem com tampão fosfato de sódio, na presença de NaCl (1 mol/L), pH 7,5. E: Eluição com tampão fosfato de sódio, na presença de NaCl (1 mol/L), pH 7,5. E: Eluição com tampão fosfato de sódio, na presença de NaCl (1 mol/L), contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5. R: Regeneração com EDTA 100 mmol/L, pH 7,0. Gel de eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras: M – Marcador de baixa massa molecular; IgG – Marcador de IgG; A – Solução de injeção; L – Lavagem; E – Eluição

**Tabela C-6:** Balanço de massa da cromatografia em gel de agarose-CM-Asp-Cu(II) utilizando tampão de equilíbrio e lavagem fosfato de sódio, na presença de NaCI (1 mol/L), pH 7,5; eluição: fosfato de sódio, na presença de NaCI (1 mol/L), contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5 e regeneração: EDTA 100 mmol/L, pH 7,0.

Frações	PT <sup>a</sup> (mg)	% <sup>b</sup>
Injeção	$3,49 \pm 0,16$	100,00
Lavagem	0,88 ± 0,11	25,33
Eluição	2,71 ± 0,16	77,47
Regeneração	$0,00 \pm 0,00$	0,00
Recuperação	$3,59 \pm 0,29$	102,80
Proteínas totais adsorvidas (mg)	2,71 ± 0,16	-
Proteínas totais adsorvidas (mg/mL)	$0,90 \pm 0,05$	-

<sup>b</sup> Massa de fragmentos de IgG em cada etapa dividida pela massa de fragmentos de IgG inicial no processo x 100



**Figura C-13:** (a) Início da curva de ruptura no gel agarose-CM-Asp-Cu(II) em tampão fosfato de sódio, com NaCl (1,0 mol/L), em pH 7,5. Leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/L. I: Injeção de 33,0 mL de solução de digestão (Fab e Fc de IgG humana) na concentração de 0,97 mg/mL. (b) L: Lavagem tampão fosfato de sódio, com NaCl (1,0 mol/L), pH 7,5. E: Eluição tampão fosfato de sódio, com NaCl (1,0 mol/L), contendo 100,0 mmol/L de imidazol, pH 7,5. R: Regeneração com EDTA 100 mmol/L, pH 7,0.

**Tabela C-7:** Balanço de massa da curva de ruptura em gel de agarose-CM-Asp-Cu(II) utilizando tampão de equilíbrio e lavagem fosfato de sódio, na presença de NaCl 1 mol/L, pH 7,5; eluição: fosfato de sódio, na presença de NaCl 1 mol/L, contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5 e regeneração: EDTA 100 mmol/L, pH 7,0.

Frações	PT <sup>a</sup> (mg)	% <sup>b</sup>
Injeção	90,87 ± 1,77	100,00
Flowthrough	46,52 ± 0,35	51,19
Lavagem	22,64 ± 1,08	24,91
Eluição	28,20 <u>+</u> 2,59	31,03
Regeneração	0,15 ± 0,01	0,16
Recuperação	97,50 ± 1,86	107,29
Proteínas totais adsorvidas (mg)	74,86 ± 2,93	-
Proteínas totais adsorvidas (mg/mL)	24,96 ± 0,98	-

<sup>a</sup> Proteína Total: Média da Massa calculada por meio da dosagem de proteínas totais (método de Bradford, 1976)

<sup>b</sup> Massa de fragmentos de IgG em cada etapa dividida pela massa de fragmentos de IgG inicial no processo x 100

## **APÊNDICE D**

Cromatogramas, eletroforeses e balanços de massas, em duplicata, dos experimentos realizados com os ligantes CM-Asp-Co(II), empregando os tampões de adsorção Hepes, Tris-HCI e fosfato de sódio todos a 25 mmol/L, pH 7,5 na ausência e presença de na presença de NaCI (1 mol/L), pH 7,5 e de eluição por adição de imidazol (100 mmol/L). Os resultados apresentados neste apêndice são referentes aos apresentados no item 4.1



**Figura D-1:** Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) de adsorção de fragmentos de IgG a partir de solução contendo fragmentos Fab e Fc em coluna contendo gel agarose-CM-Asp-Co(II) utilizando sistema tamponante Hepes, na ausência de NaCl, em pH 7,5. Leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. I: Injeção de 1,0 mL de solução contendo fragmentos Fab e Fc de IgG humana na concentração de 3,30 mg/mL. L: Lavagem com tampão Hepes, na ausência de NaCl, pH 7,5. E: Eluição com tampão Hepes, na ausência de NaCl, pH 7,5. E: Eluição com tampão Hepes, na ausência de NaCl, contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5. R: Regeneração com EDTA 100 mmol/L, pH 7,0. Gel de eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras: M – Marcador de baixa massa molecular; IgG – Marcador de IgG; A – Solução de injeção; L – Lavagem; E – Eluição.



**Figura D-2:** Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) de adsorção de fragmentos de IgG a partir de solução contendo fragmentos Fab e Fc em coluna contendo gel agarose-CM-Asp-Co(II) utilizando sistema tamponante Hepes, na ausência de NaCl, em pH 7,5. Leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. I: Injeção de 1,0 mL de solução contendo fragmentos Fab e Fc de IgG humana na concentração de 3,55 mg/mL. L: Lavagem com tampão Hepes, na ausência de NaCl, pH 7,5. E: Eluição com tampão Hepes, na ausência de NaCl, contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5. R: Regeneração com EDTA 100 mmol/L, pH 7,0. Gel de eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras: M – Marcador de baixa massa molecular; IgG – Marcador de IgG; A – Solução de injeção; L – Lavagem; E – Eluição.

Tabela	D-1:	Balanço	de massa	a da cro	matografia	em	gel c	de ag	garose-	CM-As	sp-Co(II	) utiliz	zando
tampão	de ec	uilíbrio e	lavagem	Hepes 2	5 mmol/L,	pH 7	7,5; e	luiçâ	io: Hep	es cor	ntendo 1	100 m	mol/L
de imida	azol, p	oH 7,5 e r	egeneraç	ão: EDT	A 100 mm	ol/L,	pH 7	,0.					

Frações	PT <sup>a</sup> (mg)	% <sup>b</sup>
Injeção	$3,50 \pm 0,28$	100,00
Lavagem	$0,37 \pm 0,60$	81,61
Eluição	$2,92 \pm 0,34$	18,17
Regeneração	$0,23 \pm 0,03$	0,59
Recuperação	3,51 ± 0,30	100,37
Proteínas totais adsorvidas (mg)	$0,67 \pm 0,30$	-
Proteínas totais adsorvidas (mg/mL)	0,22 ± 0,10	-

Bradford, 1976) <sup>b</sup> Massa de fragmentos de IgG em cada etapa dividida pela massa de fragmentos de IgG inicial no processo x 100

**Tabela D-2:** Balanço de massa da cromatografia em gel de agarose-CM-Asp-Co(II) utilizando tampão de equilíbrio e lavagem Hepes, na presença de NaCl 1 mol/L, pH 7,5; eluição: Hepes, na presença de NaCl 1 mol/L, contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5 e regeneração: EDTA 100 mmol/L, pH 7,0.

Frações	PT <sup>a</sup> (mg)	% <sup>b</sup>
Injeção	3,50 ± 0,12	100,00
Lavagem	$3,38 \pm 0,28$	96,47
Eluição	$0,02 \pm 0,00$	0,68
Regeneração	0,01 ± 0,01	0,32
Recuperação	3,51 ± 0,00	97,47
Proteínas totais adsorvidas (mg)	$0,04 \pm 0,01$	-
Proteínas totais adsorvidas (mg/mL)	0,01 ± 0,00	-

<sup>a</sup> Proteína Total: Média da Massa calculada por meio da dosagem de proteínas totais (método de Bradford, 1976)
<sup>b</sup> Massa de fragmentos de IgG em cada etapa dividida pela massa de fragmentos de IgG inicial no

<sup>o</sup> Massa de fragmentos de IgG em cada etapa dividida pela massa de fragmentos de IgG inicial no processo x 100



**Figura D-3:** Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) de adsorção de fragmentos de IgG a partir de solução contendo fragmentos Fab e Fc em coluna contendo gel agarose-CM-Asp-Co(II) utilizando sistema tamponante Tris-HCI, na ausência de NaCI, em pH 7,5. Leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/L. I: Injeção de 1,0 mL de solução contendo fragmentos Fab e Fc de IgG humana na concentração de 3,45 mg/mL. L: Lavagem com tampão Tris-HCI, na ausência de NaCI, o mmol/L de imidazol, pH 7,5. E: Eluição com tampão Tris-HCI, na ausência de NaCI, contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5. R: Regeneração com EDTA 100 mmol/L, pH 7,0. Gel de eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras: M – Marcador de baixa massa molecular; IgG – Marcador de IgG; A – Solução de injeção; L – Lavagem; E – Eluição.



**Figura D-4:** Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) de adsorção de fragmentos de IgG a partir de solução contendo fragmentos Fab e Fc em coluna contendo gel agarose-CM-Asp-Co(II) utilizando sistema tamponante Tris-HCI, na ausência de NaCI, em pH 7,5. Leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. I: Injeção de 1,0 mL de solução contendo fragmentos Fab e Fc de IgG humana na concentração de 3,65 mg/mL. L: Lavagem com tampão Tris-HCI, na ausência de NaCI, pH 7,5. E: Eluição com tampão Tris-HCI, na ausência de NaCI, contendo 100,0 mmol/L de imidazol, pH 7,5. R: Regeneração com EDTA 100 mmol/L, pH 7,0. Gel de eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras: M – Marcador de baixa massa molecular; IgG – Marcador de IgG; A – Solução de injeção; L – Lavagem; E – Eluição.

**Tabela D-3:** Balanço de massa da cromatografia em gel de agarose-CM-Asp-Co(II) utilizando tampão de equilíbrio e lavagem Tris-HCI, pH 7,5; eluição: Tris-HCI, contendo 100,0 mmol/L de imidazol, pH 7,5 e regeneração: EDTA 100 mmol/L, pH 7,0.

Frações	PT <sup>a</sup> (mg)	% <sup>b</sup>
Injeção	3,55 ± 0,10	100,00
Lavagem	3,07 ± 0,15	86,34
Eluição	$0,43 \pm 0,03$	12,11
Regeneração	$0,02 \pm 0,02$	0,42
Recuperação	$3,50 \pm 0,18$	98,59
Proteínas totais adsorvidas (mg)	$0,47 \pm 0,04$	-
Proteínas totais adsorvidas (mg/mL)	0,15 ± 0,02	-

<sup>b</sup> Massa de fragmentos de IgG em cada etapa dividida pela massa de fragmentos de IgG inicial no processo x 100

**Tabela D-4:** Balanço de massa da cromatografia em gel de agarose-CM-Asp-Co(II) utilizando tampão de equilíbrio e lavagem Tris-HCl, na presença de NaCl (1M), pH 7,5; eluição: Tris-HCl, na presença de NaCl 1 mol/L, contendo 100,0 mmol/L de imidazol, pH 7,5 e regeneração: EDTA 100 mmol/L, pH 7,0.

Frações	PT <sup>a</sup> (mg)	% <sup>b</sup>
Injeção	$3,42 \pm 0,05$	100,00
Lavagem	$3,39 \pm 0,08$	99,12
Eluição	$0,03 \pm 0,00$	0,88
Regeneração	$0,00 \pm 0,00$	0,00
Recuperação	$3,42 \pm 0,08$	100,00
Proteínas totais adsorvidas (mg)	$0,03 \pm 0,00$	-
Proteínas totais adsorvidas (mg/mL)	0,01 ± 0,00	-

<sup>a</sup> Proteína Total: Média da Massa calculada por meio da dosagem de proteínas totais (método de Bradford, 1976)
<sup>b</sup> Massa de fragmentos de IgG em cada etapa dividida pela massa de fragmentos de IgG inicial no

<sup>o</sup> Massa de fragmentos de IgG em cada etapa dividida pela massa de fragmentos de IgG inicial no processo x 100
Tabela D-5: Balanço de massa da cromatografia em gel de agarose-CM-Asp-Co(II)	utilizando
tampão de equilíbrio e lavagem Fosfato de sódio, pH 7,5; eluição fosfato de sódio,	contendo
100,0 mmol/L de imidazol, pH 7,5 e regeneração: EDTA 100 mmol/L, pH 7,0.	

Frações	PT <sup>a</sup> (mg)	% <sup>b</sup>
Injeção	$3,52 \pm 0,04$	100,00
Lavagem	$3,57 \pm 0,02$	101,42
Eluição	$0,06 \pm 0,01$	1,56
Regeneração	0,01 ± 0,01	0,28
Recuperação	$3,63 \pm 0,03$	103,13
Proteínas totais adsorvidas (mg)	0,06 ± 0,01	-
Proteínas totais adsorvidas (mg/mL)	$0,02 \pm 0,00$	-

Bradford, 1976) <sup>b</sup> Massa de fragmentos de IgG em cada etapa dividida pela massa de fragmentos de IgG inicial no processo x 100

Tabela D-6: Balanço de massa da cromatografia em gel de agarose-CM-Asp-Co(II) utilizando tampão de equilíbrio e lavagem fosfato de sódio, na presença de NaCl (1M), pH 7,5; eluição: fosfato de sódio, na presença de NaCl 1 mol/L, contendo 100,0 mmol/L de imidazol, pH 7,5 e regeneração: EDTA 100 mmol/L, pH 7,0.

Frações	PT <sup>a</sup> (mg)	% <sup>b</sup>
Injeção	$3,53 \pm 0,15$	100,00
Lavagem	$3,49 \pm 0,17$	98,87
Eluição	$0,02 \pm 0,01$	0,57
Regeneração	$0,00 \pm 0,00$	0,00
Recuperação	3,51 ± 0,15	99,43
Proteínas totais adsorvidas (mg)	$0,02 \pm 0,00$	-
Proteínas totais adsorvidas (mg/mL)	0,01 ± 0,00	-

<sup>a</sup> Proteína Total: Média da Massa calculada por meio da dosagem de proteínas totais (método de Bradford, 1976) <sup>b</sup> Massa de fragmentos de IgG em cada etapa dividida pela massa de fragmentos de IgG inicial no

processo x 100



**Figura D-5:** (a) Curva de ruptura no gel agarose-CM-Asp-Co(II) utilizando sistema tamponante Hepes, em pH 7,5. Leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. I: Injeção de 86,0 mL de solução de IgG humana clivada na concentração de 2,09 mg/mL. (b) L: Lavagem com tampão Hepes, pH 7,5. E: Eluição com tampão Hepes, contendo 100,0 mmol/L de imidazol, pH 7,5. R: Regeneração com EDTA 100 mmol/L, pH 7,0.

**Tabela D-7:** Balanço de massa da curva de ruptura em gel de agarose-CM-Asp-Co(II) utilizando tampão de equilíbrio e lavagem Hepes, pH 7,5; eluição: Hepes, contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5 e regeneração: EDTA 100 mmol/L, pH 7,0.

Frações	PT <sup>a</sup> (mg)	% <sup>b</sup>
Injeção	178,73 ± 1,27	100,00
Flowthrough	129,93 ± 1,68	72,70
Lavagem	30,96 ± 1,43	17,32
Eluição	13,32 ± 0,41	7,45
Regeneração	1,17 ± 0,01	0,65
Recuperação	175,37 <u>+</u> 3,51	98,12
Proteínas totais adsorvidas (mg)	144,42 <u>+</u> 2,09	-
Proteínas totais adsorvidas (mg/mL)	48,14 ± 0,70	-

<sup>b</sup> Massa de fragmentos de IgG em cada etapa dividida pela massa de fragmentos de IgG inicial no processo x 100

## **APÊNDICE E**

Cromatogramas, eletroforeses e balanços de massas, em duplicata, dos experimentos realizados com os ligantes CM-Asp-Zn(II), empregando os tampões de adsorção Hepes, Tris-HCI e fosfato de sódio todos a 25 mmol/L, pH 7,5 na ausência e presença de na presença de NaCI (1 mol/L), pH 7,5 e de eluição por adição de imidazol (100 mmol/L). Os resultados apresentados neste apêndice são referentes aos apresentados no item 4.1



**Figura E-1:** Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) de adsorção de fragmentos de IgG a partir de solução contendo fragmentos Fab e Fc em coluna contendo gel agarose-epicloridrina-CM-Asp-Zn(II) utilizando sistema tamponante Hepes, na ausência de NaCl, em pH 7,5. Leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. I: Injeção de 1,0 mL de solução contendo fragmentos Fab e Fc de IgG humana na concentração de 3,51 mg/mL. L: Lavagem com tampão Hepes, na ausência de NaCl, pH 7,5. E: Eluição com tampão Hepes, na ausência de NaCl, contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5. R: Regeneração com EDTA 100 mmol/L, pH 7,0. Gel de eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras: M – Marcador de baixa massa molecular; IgG – Marcador de IgG; A – Solução de injeção; L – Lavagem; E – Eluição



**Figura E-2:** Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) de adsorção de fragmentos de IgG a partir de solução contendo fragmentos Fab e Fc em coluna contendo gel agarose-epicloridrina-CM-Asp-Zn(II) utilizando sistema tamponante Hepes, na ausência de NaCl, em pH 7,5. Leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. I: Injeção de 1,0 mL de solução contendo fragmentos Fab e Fc de IgG humana na concentração de 3,34 mg/mL. L: Lavagem com tampão Hepes, na ausência de NaCl , pH 7,5. E: Eluição com tampão Hepes, na ausência de NaCl, contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5. R: Regeneração com EDTA 100 mmol/L, pH 7,0. Gel de eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras: M – Marcador de baixa massa molecular; IgG – Marcador de IgG; A – Solução de injeção; L – Lavagem; E – Eluição

**Tabela E-1:** Balanço de massa da cromatografia em gel de agarose-CM-Asp-Zn(II) utilizando tampão de equilíbrio e lavagem Hepes, pH 7,5; eluição: Hepes, contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5 e regeneração: EDTA 100 mmol/L, pH 7,0.

Frações	PT <sup>a</sup> (mg)	% <sup>b</sup>
Injeção	$3,42 \pm 0,09$	100,00
Lavagem	$2,19 \pm 0,04$	63,93
Eluição	$0,90 \pm 0,08$	26,16
Regeneração	$0,19 \pm 0,02$	5,47
Recuperação	$3,27 \pm 0,10$	95,56
Proteínas totais adsorvidas (mg)	1,08 ± 0,07	-
Proteínas totais adsorvidas (mg/mL)	0,36 ± 0,02	-

<sup>b</sup> Massa de fragmentos de IgG em cada etapa dividida pela massa de fragmentos de IgG inicial no processo x 100

Tabela E-2: Balanço de massa da cromatografia em gel de agarose-CM-Asp-Zn(II) utilizando tampão de equilíbrio e lavagem Hepes, na presença de NaCl (1mol/L), pH 7,5; eluição: Hepes, na presença de NaCl (1mol/L), contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5 e regeneração: EDTA 100 mmol/L, pH 7,0.

Frações	PT <sup>a</sup> (mg)	% <sup>b</sup>
Injeção	$3,42 \pm 0,09$	100,00
Lavagem	$2,19 \pm 0,04$	63,93
Eluição	$0,90 \pm 0,08$	26,16
Regeneração	$0,19 \pm 0,02$	5,47
Recuperação	3,27 ± 0,10	95,56
Proteínas totais adsorvidas (mg)	$1,08 \pm 0,07$	-
Proteínas totais adsorvidas (mg/mL)	0,36 ± 0,02	-

<sup>a</sup> Proteína Total: Média da Massa calculada por meio da dosagem de proteínas totais (método de Bradford, 1976) <sup>b</sup> Massa de fragmentos de IgG em cada etapa dividida pela massa de fragmentos de IgG inicial no

processo x 100



**Figura E-3:** Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) de adsorção de fragmentos de IgG a partir de solução contendo fragmentos Fab e Fc em coluna contendo gel agarose-epicloridrina-CM-Asp-Zn(II) utilizando sistema tamponante Hepes, na ausência de NaCI, em pH 7,5. Leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. I: Injeção de 1,0 mL de solução contendo fragmentos Fab e Fc de IgG humana na concentração de 3,45 mg/mL. L: Lavagem com tampão Hepes, na ausência de NaCI, pH 7,5. E: Eluição com tampão Hepes, na ausência de NaCI, contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5. R: Regeneração com EDTA 100 mmol/L, pH 7,0. Gel de eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras: M – Marcador de baixa massa molecular; IgG – Marcador de IgG; A – Solução de injeção; L – Lavagem; E – Eluição



**Figura E-4:** Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) de adsorção de fragmentos de IgG a partir de solução contendo fragmentos Fab e Fc em coluna contendo gel agarose-epicloridrina-CM-Asp-Zn(II) utilizando sistema tamponante Hepes, na ausência de NaCl, em pH 7,5. Leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. I: Injeção de 1,0 mL de solução contendo fragmentos Fab e Fc de IgG humana na concentração de 3,44 mg/mL. L: Lavagem com tampão Hepes, na ausência de NaCl , pH 7,5. E: Eluição com tampão Hepes, na ausência de NaCl, contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5. R: Regeneração com EDTA 100 mmol/L, pH 7,0. Gel de eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras: M – Marcador de baixa massa molecular; IgG – Marcador de IgG; A – Solução de injeção; L – Lavagem; E – Eluição

**Tabela E-3:** Balanço de massa da cromatografia em gel de agarose-CM-Asp-Zn(II) utilizando tampão de equilíbrio e lavagem Tris-HCI, pH 7,5; eluição: Tris-HCI, contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5 e regeneração: EDTA 100 mmol/L, pH 7,0.

Frações	PT <sup>a</sup> (mg)	% <sup>b</sup>
Injeção	3,44 ± 0,01	100,00
Lavagem	2,57 ± 0,02	74,76
Eluição	$0,63 \pm 0,02$	18,35
Regeneração	$0,00 \pm 0,00$	0,00
Recuperação	3,21± 0,01	93,10
Proteínas totais adsorvidas (mg)	0,63 ± 0,02	-
Proteínas totais adsorvidas (mg/mL)	0,21± 0,01	-

<sup>b</sup> Massa de fragmentos de IgG em cada etapa dividida pela massa de fragmentos de IgG inicial no processo x 100

**Tabela E-4:** Balanço de massa da cromatografia em gel de agarose-CM-Asp-Zn(II) utilizando tampão de equilíbrio e lavagem Tris-HCl, na presença de NaCl (1 mol/L), pH 7,5; eluição: Tris-HCl na presença de NaCl (1 mol/L), contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5 e regeneração: EDTA 100 mmol/L, pH 7,0.

Frações	PT <sup>a</sup> (mg)	% <sup>b</sup>
Injeção	$3,62 \pm 0,10$	100,00
Lavagem	$3,47 \pm 0,02$	95,64
Eluição	0,03 ± 0,01	0,88
Regeneração	$0,00 \pm 0,00$	0,00
Recuperação	$3,50 \pm 0,02$	96,52
Proteínas totais adsorvidas (mg)	0,03 ± 0,01	-
Proteínas totais adsorvidas (mg/mL)	0,01 ± 0,00	-

<sup>a</sup> Proteína Total: Média da Massa calculada por meio da dosagem de proteínas totais (método de Bradford, 1976)
<sup>b</sup> Massa de fragmentos de IgG em cada etapa dividida pela massa de fragmentos de IgG inicial no

<sup>o</sup> Massa de fragmentos de IgG em cada etapa dividida pela massa de fragmentos de IgG inicial no processo x 100

**Tabela E-5:** Balanço de massa da cromatografia em gel de agarose-CM-Asp-Zn(II) utilizando tampão de equilíbrio e lavagem Fosfato de sódio, pH 7,5; eluição: Tris-HCI, contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5 e regeneração: EDTA 100 mmol/L, pH 7,0.

Frações	PT <sup>a</sup> (mg)	% <sup>b</sup>
Injeção	3,61 ± 0,01	100,00
Lavagem	3,51 ± 0,06	97,17
Eluição	$0,15 \pm 0,05$	4,17
Regeneração	$0,01 \pm 0,00$	0,21
Recuperação	$3,66 \pm 0,02$	101,55
Proteínas totais adsorvidas (mg)	0,16 ± 0,04	-
Proteínas totais adsorvidas (mg/mL)	0,05 ± 0,01	-

<sup>b</sup> Massa de fragmentos de IgG em cada etapa dividida pela massa de fragmentos de IgG inicial no processo x 100

Tabela E-6: Balanço de massa da cromatografia em gel de agarose-CM-Asp-Zn(II) utilizando tampão de equilíbrio e lavagem fosfato de sódio, na presença de NaCl (1 mol/L), pH 7,5; eluição: fosfato de sódio, na presença de NaCI (1 mol/L), contendo 100 mmol/L de imidazol, pH 7,5 e regeneração: EDTA 100 mmol/L, pH 7,0.

Frações	PT <sup>a</sup> (mg)	% <sup>b</sup>
Injeção	$3,56 \pm 0,00$	100,00
Lavagem	$3,50 \pm 0,06$	98,51
Eluição	$0,07 \pm 0,04$	1,87
Regeneração	0,01 ± 0,00	0,21
Recuperação	$3,58 \pm 0,10$	100,59
Proteínas totais adsorvidas (mg)	$0,07 \pm 0,04$	-
Proteínas totais adsorvidas (mg/mL)	0,02 ± 0,02	-

<sup>a</sup> Proteína Total: Média da Massa calculada por meio da dosagem de proteínas totais (método de Bradford, 1976) <sup>b</sup> Massa de fragmentos de IgG em cada etapa dividida pela massa de fragmentos de IgG inicial no

processo x 100