

B

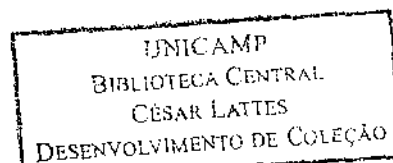
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Engenharia Química
Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

**PURIFICAÇÃO DE IgG A PARTIR DO PLASMA HUMANO POR
CROMATOGRAFIA EM MEMBRANAS COM ÍONS Cu(II) e Ni(II)
IMOBILIZADOS: EFEITO DOS AGENTES QUELANTES IDA, TREN E CM-ASP**

Eng^a Mariana Borsoi Ribeiro
Doutoranda
Prof^a Dr^a Sônia Maria Alves Bueno
Orientadora

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutor em Engenharia Química

Campinas, São Paulo
julho de 2006



UNIDADE	BC
Nº CHAMADA:	T/UNICAMP
	R354p
V.	Ed.
TOMBO BC/	12001
PROC.	16.145-07
C	☐ D ☒
PREÇO	11,00
DATA	18/04/07
BIB-ID	407782

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE -
UNICAMP

R354p

Ribeiro, Mariana Borsoi

Purificação de IgG a partir do plasma humano por cromatografia em membranas com íons Cu(II) e Ni(II) imobilizados: efeito dos agentes quelantes IDA, TREN e CM-Asp / Mariana Borsoi Ribeiro.--Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientador: Sônia Maria Alves Bueno.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química.

I. Cromatografia de afinidade. 2. Imunoglobulina G. 3. Íons metálicos. 4. Purificação. 5. Membranas. I. Bueno, Sônia Maria Alves. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Titulo em Inglês: IgG purification from human plasma by membrane affinity chromatography with immobilized Cu(II) and Ni(II): effect of quelators IDA, TREN and CM-Asp.

Palavras-chave em Inglês: Affinity membrane; Purification; Immunoglobulin G; Metal ions.

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos.

Titulação: Doutor em Engenharia Química

Banca examinadora: Gisella Maria Zanin, Ricardo de Lima Zollner, Leila Peres e Maria Helena Andrade Santana.

Data da defesa: 10/07/2006

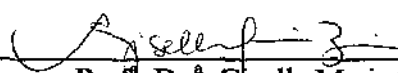
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

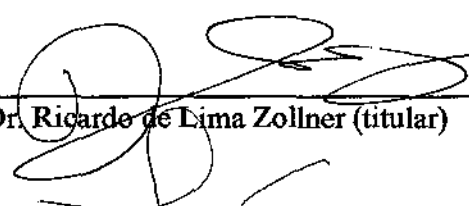
Faculdade de Engenharia Química

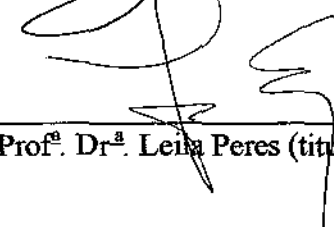
Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

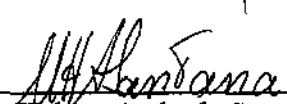
Tese de doutorado defendida por Mariana Borsoi Ribeiro e aprovada em 10 de julho de 2006 pela banca examinadora constituída pelos doutores:


Prof.^a. Dr.^a. Sônia Maria Alves Bueno - orientador


Prof.^a. Dr.^a. Gisella Maria Zanin (titular)

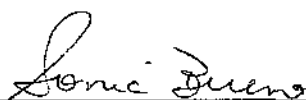

Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner (titular)


Prof.^a. Dr.^a. Leila Peres (titular)


Prof.^a. Dr.^a. Maria Helena Andrade Santana (titular)

20071607240

Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado em Engenharia Química defendida por Mariana Borsoi Ribeiro em 10 de julho de 2006.

A handwritten signature in cursive script, reading "Sônia Bueno", is written over a horizontal line.

Sônia Maria Alves Bueno - orientador

Aos meus pais Matildes e Raul e ao Fabio

AGRADECIMENTOS

Gostaria de deixar o meu mais profundo agradecimento àqueles que de alguma forma contribuíram para esta conquista, em especial:

À minha mãe Matildes, meu pai Raul e aos irmãos Thiago e Marisa pelo amor e dedicação em todas as etapas da minha vida.

Ao Fabio pelo amor e apoio

À minha avó Ionne pelas orações e incentivo.

À Prof^a Dr^a Sônia Maria Alves Bueno, pela paciência e competência na orientação deste trabalho e pelos ensinamentos na minha vida profissional.

À Prof^a Dr^a M. Vijayalakshmi e Dr^a. Cecile Legallais da Université de Technologie de Compiègne (UTC – França), por terem permitido a realização do estágio de doutorado sanduíche e pelos conhecimentos científicos adquiridos.

Aos amigos de laboratório da UTC, França: Daniela, Jérôme, Allia, Juthy e Kassem pelo apoio e suporte técnico.

Aos professores do DPB: Ângela Moraes, César Santana, Maria Helena Santana e Everson Miranda pelos conhecimentos adquiridos durante o doutorado. Em especial aos proessores Everson e Ângela por disponibilizarem as instalações de seus laboratórios.

As Prof^{as} Marisa Beppu e Maria Helena Santana pelas sugestões dadas no exame de qualificação que muito colaboraram para a finalização da tese.

Aos amigos do DPB: Rosa, Igor, Paula, Érika, Goran, Tashima, Moyses, Ivanildo, Alessandra, João Paulo, Amaro, Lucimara, Moyses, Fabiana, Ana Paula, Paula Marreco, Rachel, Romi, Rosana, Adriano, Geórgia, Leonardo, Gisele, Cristiane, Nemias, Francine, Marina, Vinicius e Carol

Em especial às amigas de laboratório Isa e Luciana pela paciência e amizade durante o doutorado.

Ao Goran Robic pelos experimentos realizados utilizando-se os adsorventes proteína A e G

Ao Marco do setor de Líquidos Biológicos – HC – UNICAMP pelo suporte técnico e apoio

À minha família em geral pela amizade e apoio

À FAPESP pelo apoio financeiro.

Ao CNPq pela bolsa de estudos.

À CAPES pela bolsa de estudos na França (doutorado sanduíche)

RESUMO

As imunoglobulinas do isotipo G (IgG) são usadas enormemente em aplicações terapêuticas e são requeridas, usualmente, com um elevado grau de pureza. Várias técnicas cromatográficas vêm sendo investigadas para a purificação de IgG a partir do plasma humano. Neste trabalho, investigou-se o efeito dos agentes quelantes ácido iminodiácetico (IDA), ácido aspártico carboxi-metilado (CM-Asp) e Tris-2(aminoetil)amina (TREN) na purificação de IgG a partir do plasma humano utilizando a técnica de cromatografia de afinidade com os íons metálicos imobilizados em membranas de fibras ocas. Para tanto, foram realizados experimentos de adsorção em diferentes sistemas tamponantes em membranas de álcool de poli(etileno) vinílico (PEVA) finamente cortadas e em módulos de filtração derivatizados com IDA, TREN e CM-Asp, utilizando-se os íons metálicos níquel e cobre. A seletividade dos adsorventes foi verificada por eletroforese SDS-PAGE e análise nefelométrica. As melhores condições de purificação foram encontradas utilizando-se as membranas PEVA-CM-Asp-Ni(II) em módulo de filtração, em presença do tampão Tris-HCl 25 mM pH 7,0 e eluição por acréscimo da concentração de Tris, sendo obtida IgG com aproximadamente 90% de pureza. As membranas de PEVA-CM-Asp-Ni(II) em módulos de filtração apresentaram melhor seletividade, segundo eletroforese SDS-PAGE, e capacidade dinâmica de adsorção maior comparadas às membranas finamente cortadas (capacidade média de adsorção: 53,0 e 7,7 mg de IgG por g seca de membrana, respectivamente). O modelo de Langmüir ajustou-se às isotermas de adsorção, à temperatura ambiente, mostrando alta capacidade de adsorção para os sistemas PEVA-IDA-Ni(II) e PEVA-CM-Asp-Ni(II) (204,6 e 302,3 mg/g seca de membrana, respectivamente) e constantes de dissociação característica de sistemas de média afinidade ($6,1$ e $10,1 \times 10^{-6}$ M, respectivamente). A análise dos parâmetros termodinâmicos encontrados para o sistema modelo PEVA-IDA-Ni(II)-IgG, indicaram a complexidade das interações, indicando a existência de interações hidrofóbicas, eletrostáticas e de ligações de coordenação. Neste trabalho, conseguiu-se purificar IgG a partir do plasma humano em uma única etapa, utilizando-se a técnica da cromatografia em membranas de afinidade, demonstrando a alta potencialidade da utilização do método desenvolvido em processos industriais.

ABSTRACT

The use of immunoglobulin G (IgG) in therapeutic applications has growing vastly and it is used in the treatment of a growing number of indications. Several chromatographic techniques have been investigated for IgG purification. In this work, we investigated the effect of the chelators iminodiacetic acid (IDA), carboxymethylaspartate acid (CM-Asp) and Tris-2(aminoethyl)amine (TREN) for IgG purification from human plasma using Immobilized Metal-ion Affinity Chromatography (IMAC) technique using hollow fibers membranes as support to the chromatographic experiments. For that, adsorption experiments were done, using different buffers systems, on filtration module and on finely cut poly(ethylene) vinyl alcohol (PEVA) membranes containing chelators IDA, TREN and CM-Asp with the metallic ions nickel and copper. The adsorbent selectivity was verified through electrophoresis SDS-PAGE and nefelometric analysis. Best purification conditions were found with PEVA-CM-Asp-Ni(II) filtration module in the presence of 25 mM Tris-HCl pH 7.0 and elution by increasing Tris concentration. In this case, it was possible to obtain IgG with approximately 90% of purity. According to electrophoresis SDS-PAGE and nefelometric analysis, PEVA-CM-Asp-Ni(II) filtration modules showed better selectivity and superior adsorption dynamic capacity for IgG than those obtained by finely cut membranes (medium adsorption capacity: 53.0 and 7.7 mg of IgG /g of dry membrane, respectively). Lagmüir model adjusted to adsorption isotherms at room temperature (25° C) showed high adsorption capacity for PEVA-IDA-Ni(II) and PEVA-CM-Asp-Ni(II) systems (204.6 and 302.3 mg/g dry of membrane, respectively) and showed dissociation constants characteristic of medium affinity systems (6.1 and 10.1×10^{-6} M, respectively). The thermodynamic parameters analysis obtained for PEVA-IDA-Ni(II)-IgG system indicated the complexity of the interactions, and the existence of hydrophobic and electrostatics interaction besides the coordination bound. In this work, we could purify IgG from human plasma in a single stage, using the affinity chromatographic membranes technique, allowing in this way, the treatment of great volumes per unit of time, showing the high potentiality of this method in industrial processes.

SUMÁRIO

Resumo	xiii
Abstract	xv
CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 IMUNOGLOBULINAS HUMANAS: ESTRUTURA E FUNÇÃO	5
2.2 PURIFICAÇÃO DE IgG	8
<i>Cromatografia de afinidade para a purificação de IgG humana</i>	10
2.3 CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE COM ÍONS METÁLICOS IMOBILIZADOS (IMAC)	15
2.3.1 Seleção do íon metálico e do agente quelante	16
2.3.2 Condições de adsorção e eluição em IMAC	21
2.3.2 Purificação de anticorpos utilizando a técnica de IMAC	22
2.4 MEMBRANAS DE AFINIDADE	24
CAPÍTULO 3: MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1 MATERIAIS	29
3.1.1 Reagentes.....	29
3.1.2 Matrizes	30
3.1.3 Plasma humano	31
3.2 MÉTODOS	31
3.2.1 Quantificação e identificação de proteínas	31
3.2.1.1 Quantificação de proteínas totais	31
3.2.1.2 Eletroforese SDS-PAGE	32

3.2.1.3 Dosagem das concentrações de IgG, IgA, IgM, transferrina e albumina	32
3.2.2 Imobilização dos agentes quelantes ao gel de agarose e membranas de PEVA finamente cortadas	32
<i>Ativação da matriz com epícloridrina</i>	33
<i>Ativação da matriz com 1,4 butanodiol diglicidil éter (bisoxirano)</i>	33
<i>Imobilização de ácido iminodiacético (IDA)</i>	34
<i>Imobilização de tris-(2-1mino-etil)amina (TREN)</i>	34
<i>Imobilização do ácido aspártico carboxi-metilado (CM-Asp)</i>	35
3.2.3 Determinação da quantidade de ligantes imobilizados	35
3.2.4 Experimentos cromatográficos em matrizes contendo íons metálicos imobilizados	36
3.2.5 Determinação das isothermas de adsorção	38
3.2.6 Determinação dos parâmetros termodinâmicos da adsorção	40
3.2.7 Determinação da curva de ruptura	41
3.2.7.1 Construção do módulo	41
3.2.7.2 Ativação e imobilização do ligante nas membranas contidas em módulos	42
3.2.7.3 Experimentos de filtração para a determinação de curvas de ruptura ...	44
CAPÍTULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
4.1 PURIFICAÇÃO DE IgG HUMANA POR AFINIDADE A QUELATOS METÁLICOS (IMAC)	46
4.1.1 Avaliação da eficiência da imobilização dos agentes quelantes IDA, TREN e CM-ASP em membranas de PEVA finamente cortadas	46
4.1.1.1 Escolha do método de ativação das membranas	46
4.1.1.2 Eficiência de imobilização dos íons metálicos cobre e níquel em fibras ocas de PEVA e gel de agarose ativados por epícloridrina	49

4.1.2 Capacidade dinâmica de adsorção de IgG	52
4.1.3 Influência do sistema tamponante, do agente quelante e do íon metálico na retenção de IgG humana pré-purificada	54
4.1.4 Influência do sistema tamponante e do agente quelante na purificação de IgG a partir do plasma humano	58
4.1.4.1 Melhor condição de purificação de IgG em PEVA-TREN-Ni(II)	62
4.1.4.2 Melhor condição de purificação de IgG em PEVA-IDA-Ni(II)	64
4.1.4.3 Melhor condição de purificação de IgG em PEVA-CM-Asp-Ni(II).....	67
4.1.5 Purificação de IgG a partir de plasma humano utilizando-se géis tradicionais como matriz	69
4.1.6 Experimentos de filtração nos mini-módulos de PEVA-IDA-Ni(II), PEVA-TREN-Ni(II) e PEVA-CM-Asp-Ni(II)	73
4.1.6.1 Avaliação da eficiência da imobilização dos agentes quelantes às membranas de PEVA contidas em mini-módulos	73
4.1.6.2 Experimentos de filtração utilizando IgG pré-purificada: PEVA-AQ-Cu(II)	74
4.1.6.3 Experimentos de filtração para purificação de IgG a partir do plasma humano: PEVA-AQ-Ni(II)	76
<i>PEVA-TREN-Ni(II)</i>	76
<i>PEVA-IDA-Ni(II)</i>	79
<i>PEVA-CM-Asp-Ni(II)</i>	84
4.1.7 Isotermas de adsorção	89
4.1.7.1 Determinação da capacidade máxima e da constante de dissociação	89
4.1.7.2 Determinação de parâmetros termodinâmicos	95
4.2 DO AGENTE QUELANTE CM-Asp COMO LIGANTE PARA A PURIFICAÇÃO DE IgG A PARTIR DO PLASMA HUMANO	103
CAPÍTULO 5: CONCLUSÕES	109
CAPÍTULO 6: SUGESTÕES PARA OS PRÓXIMOS TRABALHOS	112

CAPÍTULO 7: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113
ANEXOS	125

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1: Estrutura da imunoglobulina (IgG).....	6
Figura.2.2: Classificação do sistema de afinidade baseado nos ligantes imobilizados	11
Figura 2.3: Representação esquemática dos complexos de íons metálicos quelatados	19
Figura 2.4: Esquema da cromatografia de afinidade utilizando-se membranas de fibra oca em modo operacional tangencial	26
Figura 3.1: Esquema do sistema de cromatografia para os experimentos de adsorção	37
Figura 3.2: Esquema do módulo de fibras ocas de PEVA	41
Figura 3.3: Esquema dos modos de lavagem das fibras ocas contidas no módulo de filtração	43
Figura 3.4: Esquema da montagem experimental para a ativação das membranas de fibra oca do módulo construído	43
Figura 3.5: Esquema da montagem do experimento de filtração: (a) etapa de alimentação; (b) etapa de eluição e regeneração	45
Figura 4.1: Estrutura proposta das membranas derivatizadas com os agentes quelantes a) PEVA-epicloridrina-IDA em pH neutro b) PEVA-epicloridrina-TREN em pH básico c) PEVA-epicloridrina-CM-Asp em pH neutro d) PEVA-bisoxirano-IDA em pH neutro e e) PEVA-bisoxirano-TREN em pH básico	46
Figura 4.2: Perfil da eluição de IgG humana adsorvida em presença do tampão de adsorção MA 25 mM, NaCl 1 M pH 7,0. Volume do leito: 5 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Injeção de 30 mg de IgG. Eluição gradiente degrau pH 6,0, pH 5,0 e pH 4,0; Regeneração: solução de EDTA 100 mM pH 7,0. a) íon metálico cobre, b) íon metálico níquel	55
Figura 4.3: Perfil da eluição de IgG humana adsorvida em presença do tampão Mops 25 mM, NaCl 1 M e imidazol 2 mM pH 7,0. Volume do leito: 5 mL. Vazão: 0,5 mL/min Injeção de 30 mg de IgG. Eluição degrau de acréscimo da concentração de imidazol de 10, 30, 50 e 100 mM; Regeneração: solução de EDTA 100 mM pH 7,0. a) íon metálico cobre, b) íon metálico níquel	56

Figura 4.4: Perfil da eluição de IgG humana adsorvida em presença do tampão Tris 25 mM pH 7,0. Volume do leito: 5 mL. Injeção de 30 mg de IgG. Vazão: 5 mL/min. Eluição por acréscimo da concentração de Tris de 100, 300, 500 e 700 mM; Regeneração: solução de EDTA 100 mM pH 7,0. a) íon metálico cobre; b) íon metálico níquel 57

Figura 4.5: Cromatografias realizadas com solução de plasma humano em PEVA-TREN-Ni(II). Volume de leito: 5 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Tampão de adsorção: MA 25 mM, NaCl 1 M pH 7,0; dessorção: gradiente degrau pH 6,0, pH 5,0; regeneração: EDTA 100 mM pH 7,0. Eletroforeses: (M) marcador de alta massa molecular, (I) material injetado, (1-2) correspondente aos pontos enumerados do cromatograma, (R) regeneração, (P) IgG de alta pureza (Aventis) 63

Figura 4.6: Cromatografias realizadas com solução de plasma humano em PEVA-IDA-Ni(II). Volume de leito: 5 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Tampão de adsorção: Tris-HCl 25 mM pH 7,0; dessorção: gradiente degrau do aumento da concentração de Tris 100, 300, 500 e 700 mM; regeneração: EDTA 100 mM pH 7,0. Eletroforeses: (M) marcador de alta massa molecular, (I) material injetado, (1-5) correspondente aos pontos enumerados do cromatograma, (R) regeneração, (P) IgG de alta pureza (Aventis) 65

Figura 4.7: Cromatografias realizadas com solução de plasma humano PEVA-CM-Asp-Ni(II). Volume de leito: 5 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Tampão de adsorção: Tris-HCl 25 mM pH 7,0; dessorção: gradiente degrau do aumento da concentração de Tris 100, 300, 500 e 700 mM; regeneração: EDTA 100 mM pH 7,0. Eletroforeses: (M) marcador de alta massa molecular, (I) material injetado, (1-5) correspondente aos pontos enumerados do cromatograma, (R) regeneração, (P) IgG de alta pureza (Aventis) 67

Figura 4.8: Cromatografias realizadas com solução de plasma humano em agarose-IDA-Ni(II). Volume de leito: 1 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Tampão de adsorção: Tris-HCl 25 mM, pH 7,0; dessorção: gradiente degrau do aumento da concentração de Tris 100, 300, 500 e 700 mM; Regeneração: 100 mM EDTA pH 7,0. Eletroforeses: (M) marcador de alta massa molecular, (I) material injetado, (1-5) correspondente aos pontos enumerados do cromatograma, (R) regeneração, (P) IgG de alta pureza (Aventis) 69

Figura 4.9: Cromatografias realizadas com solução de plasma humano em agarose-CM-Asp-Ni(II). Volume de leito: 1 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Tampão de adsorção: Tris-HCl 25 mM, pH 7,0; dessorção: gradiente degrau do aumento da concentração de Tris 100, 300, 500 e 700 mM. Regeneração: 100 mM EDTA pH 7,0. Eletroforeses: (M) marcador de alta massa molecular, (I) material injetado, (1-5) correspondente aos pontos enumerados do cromatograma, (R) regeneração, (P) IgG de alta pureza (Aventis) 70

- Figura 4.10:** Cromatografias realizadas com solução de plasma humano agarose-TREN-Ni(II). Volume de leito: 1 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Tampão MA 25 mM, NaCl 1 M, pH 7,0; dessorção degrau de pH, pH 6,0, pH 5,0. Regeneração: 100 mM EDTA pH 7,0. Eletroforeses: (M) marcador de alta massa molecular, (I) material injetado, (1-5) correspondente aos pontos enumerados do cromatograma, (R) regeneração, (P) IgG de alta pureza (Aventis) 70
- Figura 4.11:** Curva de ruptura obtida para linha de filtrado. Alimentação IgG pré-purificada a 10 mg/mL. Vazão alimentação: 1 mL/min. Vazão filtrado: 0,5 mL/min. Cf/Ci: Razão entre a concentração de IgG no filtrado e a concentração de IgG inicial (○) PEVA-TREN-Cu(II), (□) PEVA-CM-Asp-Cu(II) e (Δ) PEVA-IDA-Cu(II) 74
- Figura 4.12:** Curva de ruptura obtida para PEVA-TREN-Ni(II). Vazão de filtrado, $Q_F = 0,5$ mL/min. MA 25 mM, NaCl 1 M pH 7,0. Eletroforese das frações de filtrado: Faixas: (M) marcadores de alta massa molecular; (4-11) correspondentes aos pontos da curva de ruptura; (P) IgG de alta pureza (Aventis) 77
- Figura 4.13:** Perfil cromatográfico da etapa de eluição do experimento de filtração realizado com solução de plasma humano em PEVA-TREN-Ni(II). Q_i : 1,0 mL/min; Q_F : 0,5 mL/min. Tampão de adsorção: MA 25 mM, NaCl 1M pH 7,0; dessorção: gradiente degrau pH 6,0, pH 5,0; regeneração: EDTA 100 mM pH 7,0. Eletroforeses: (M) marcador de alta massa molecular, (I) material injetado, (1-2) correspondente aos pontos enumerados do cromatograma, (R) regeneração, (P) IgG de alta pureza (Aventis) 78
- Figura 4.14:** a) Curva de ruptura obtida para PEVA-IDA-Ni(II). Vazão do filtrado: (Δ) $Q_F = 0,5$ mL/min e (○) $Q_F = 0,7$ mL/min. Tampão de adsorção: Tris-HCl 25 mM pH 7,0. Eletroforese das frações de filtrado b) $Q_F = 0,5$ mL/min e c) $Q_F = 0,7$ mL/min : Faixas: (M) marcadores de alta massa molecular; (4-19) correspondentes aos pontos da curva de ruptura; (P) IgG de alta pureza (Aventis) 80
- Figura 4.15:** Perfil cromatográfico da etapa de eluição do experimento de filtração realizado com solução de plasma humano em PEVA-IDA-Ni(II). a) Q_F : 0,5 mL/min e b) Q_F : 0,7 mL/min. Tampão de adsorção: Tris-HCl 25 mM pH 7,0; dessorção: gradiente degrau do aumento da concentração de Tris 100, 300, 500 e 700 mM; regeneração: EDTA 100 mM pH 7,0. Eletroforeses: (M) marcador de alta massa molecular, (I) material injetado, (1-3) correspondente aos pontos enumerados do cromatograma, (R) regeneração, (P) IgG de alta pureza (Aventis)... 81
- Figura 4.16:** a) Curva de ruptura obtida para PEVA-CM-Asp-Ni(II). Vazão do filtrado: (Δ) $Q_F = 0,5$ mL/min e (○) $Q_F = 0,7$ mL/min. Tampão de adsorção: Tris-HCl 25 mM pH 7,0. Eletroforese das frações de filtrado b) $Q_F = 0,5$ mL/min e c) $Q_F = 0,7$ mL/min : Faixas: (M) marcadores de alta massa molecular; (4-19) correspondentes aos pontos da curva de ruptura; (P) IgG de alta pureza (Aventis)... 85

Figura 4.17: Perfil cromatográfico da etapa de eluição do experimento de filtração realizado com solução de plasma humano em PEVA-CM-Asp-Ni(II). a) Q_F : 0,5 mL/min e b) Q_F : 0,7 mL/min. Tampão de adsorção: Tris-HCl 25 mM pH 7,0; dessorção: gradiente degrau do aumento da concentração de Tris 100, 300, 500 e 700 mM; regeneração: EDTA 100 mM pH 7,0. Eletroforeses: (M) marcador de alta massa molecular, (I) material injetado, (1-3) correspondente aos pontos enumerados do cromatograma, (R) regeneração, (P) IgG de alta pureza (Aventis) ..	86
Figura 4.18: Isoterma de adsorção de IgG humana pré-purificada em membranas (Δ) PEVA-IDA-Ni(II), ($\square$) PEVA-TREN-Ni(II) e ($\circ$) PEVA-CM-Asp-Ni(II). Ajuste não linear dos parâmetros segundo modelo de Langmüir.....	90
Figura 4.19: Gráfico de Scatchard para os dados de adsorção de IgG humana pré-purificada em membranas a) PEVA-IDA-Ni(II), $R^2 = 0,81$; b) PEVA-TREN-Ni(II), $R^2 = 0,99$ e c) PEVA-CM-Asp-Ni(II), $R^2 = 0,86$	91
Figura 4.20: Isoterma de adsorção de IgG humana em (Δ) PEVA-IDA-Ni(II) e ($\circ$) PEVA-CM-Asp-Ni(II) com ajuste não linear dos parâmetros segundo modelo de Langmüir-Freundlich	94
Figura 4.21: Isoterma de adsorção de IgG humana pré-purificada em membranas PEVA-IDA-Ni(II) em presença do tampão de adsorção a) Tris-HCl 25 mM pH 7,0 e b) Tris-HCl 25 mM , NaCl 1 M pH 7,0 a diferentes temperaturas: ($\circ$) 4°C, (Δ) 15°C () 25°C e ($\bullet$) 37°C. Ajuste não linear dos parâmetros segundo modelo de Langmüir.....	96
Figura 4.22: Gráfico de Van't Hoff ($\ln(K_d)$) em função de $1/T$ para a adsorção de IgG em presença dos tampões : (Δ) Tris-HCl 25 mM pH 7,0 e ($\circ$) Tris-HCl 25 mM, 1 M NaCl pH7,0	97
Figura 4.23: Interações propostas em IMAC a) interações multi-pontos; b) interações em um único ponto	100
Figura 4.24: Isoterma de adsorção de IgG humana pré-purificada em membranas PEVA-IDA-Ni(II) em presença do tampão de adsorção a) Tris-HCl 25 mM pH 7,0 e b) Tris-HCl 25 mM , NaCl 1 M pH 7,0 a diferentes temperaturas: ($\circ$) 4°C, (Δ) 15°C () 25°C e ($\bullet$) 37°C. Ajuste não-linear dos parâmetros segundo modelo de Langmüir-Freundlich	101
Figura 4.25: Isoterma de adsorção de IgG humana pré-purificada em membranas PEVA-IDA-Ni(II) em presença do tampão de adsorção a) Tris-HCl 25 mM pH 7,0 e b) Tris-HCl 25 mM , NaCl 1 M pH 7,0 a diferentes temperaturas: ($\circ$) 4°C, (Δ) 15°C () 25°C e ($\bullet$) 37°C. Ajuste não linear dos parâmetros segundo modelo de Multicamada de Langmüir	102

Figura 4.26: Total de proteínas adsorvidas em PEVA-CM-Asp finamente cortadas. Volume do leito: 5 mL. Injeção de 8,5 mL de solução de plasma diluído 1:5 em tampão de adsorção. Vazão: 0,5 mL/min. Eluição por adição de 1 M de NaCl ao tampão de adsorção. Dosagem por nefelometria de: IgA, IgG e IgM, TRF (transferrina) 105

Figura 4.27: Cromatografia de plasma diluído 1: 5 em tampão de adsorção Mops 25 mM a pH 6,5. M- marcador de alta massa molecular; I: injeção; L- lavagem; E: eluição por adição de 1 M NaCl ao tampão de adsorção; R: regeneração: NaOH 20 mM; P- IgG de alta pureza Aventis 106

Figura 4.28: Cromatografia de plasma diluído 1: 5 em PEVA-CM-Asp. Tampão de adsorção Mes 25 mM pH 6,5; M- marcador de alta massa molecular; I: injeção; L: lavagem; E: eluição por adição de NaCl 1 M ao tampão de adsorção; R: regeneração, NaOH 20 mM; P: IgG de alta pureza Aventis..... 107

Figura A.1: Cromatografias realizadas com solução de plasma humano em PEVA-IDA-Me(II).a) Cu(II) e b) Ni(II). Volume de leito: 5 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Tampão de adsorção: MA 25 mM, NaCl 1 M pH 7,0; dessorção: gradiente de grau pH 6,0, pH 5,0 e pH 4,0; regeneração: EDTA 100 mM pH 7,0. Eletroforeses: (M) marcador de alta massa molecular, (I) material injetado, (1-4) correspondente aos pontos enumerados do cromatograma, (R) regeneração, (P) IgG de alta pureza (Aventis) 125

Figura A.2: Cromatografias realizadas com solução de plasma humano em PEVA-TREN-Me(II). a) Cu(II) e b) Ni(II). Volume de leito: 5 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Tampão de adsorção: MA 25 mM, NaCl 1 M pH 7,0; dessorção: gradiente de grau pH 6,0, pH 5,0 e pH 4,0; regeneração: EDTA 100 mM pH 7,0. Eletroforeses: (M) marcador de alta massa molecular, (I) material injetado, (1-2) correspondente aos pontos enumerados do cromatograma, (R) regeneração, (P) IgG de alta pureza (Aventis) 126

Figura A.3: Cromatografias realizadas com solução de plasma humano em PEVA-CM-Asp-Me(II). a) Cu(II) e b) Ni(II). Volume de leito: 5 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Tampão de adsorção MA 25 mM, NaCl 1 M pH 7,0; dessorção: gradiente de grau pH 6,0, pH 5,0 e pH 4,0; regeneração: mM EDTA 100mM pH 7,0. Eletroforeses: (M) marcador de alta massa molecular, (I) material injetado, (1-4) correspondente aos pontos enumerados do cromatograma, (R) regeneração, (P) IgG de alta pureza (Aventis) 127

Figura C.1: Cromatografias realizadas com solução de plasma humano em: a) PEVA-IDA-Ni(II), b) PEVA-TREN-Ni(II) e c) PEVA-CM-Asp-Ni(II). Volume de leito: 5 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Tampão de adsorção: Mops 25 mM, imidazol 2 mM, NaCl 1 M pH 7,0; dessorção: gradiente degrau do aumento da concentração de imidazol: 10, 30, 50 e 100 mM; regeneração: EDTA 100 mM pH 7,0. Eletroforeses: (M) marcador de alta massa molecular, (I) material injetado, (1-5) correspondente aos pontos enumerados do cromatograma, (R) regeneração, (P) IgG de alta pureza (Aventis) 130

Figura E.1: Cromatografias realizadas com solução de plasma humano em a) PEVA-IDA-Ni(II), b) PEVA-TREN-Ni(II) e c) PEVA-CM-Asp-Ni(II). Volume de leito: 5 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Tampão de adsorção: Tris-HCl 25 mM pH 7,0; dessorção: gradiente degrau do aumento da concentração de Tris 100, 300, 500 e 700 mM; regeneração: EDTA 100 mM pH 7,0. Eletroforeses: (M) marcador de alta massa molecular, (I) material injetado, (1-5) correspondente aos pontos enumerados do cromatograma, (R) regeneração, (P) IgG de alta pureza (Aventis) .. 134

Figura G.1: Cromatografias realizadas com solução de plasma humano em a) PEVA-IDA-Ni(II), b) PEVA-TREN-Ni(II) e c) PEVA-CM-Asp-Ni(II). Volume de leito: 5 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Tampão de adsorção: Tris-HCl 25 mM, NaCl 1M pH 7,0; dessorção: gradiente degrau do aumento da concentração de Tris 100, 300, 500 e 700 mM; regeneração: EDTA 100 mM pH 7,0. Eletroforeses: (M) marcador de alta massa molecular, (I) material injetado, (1-5) correspondente aos pontos enumerados do cromatograma, (R) regeneração, (P) IgG de alta pureza (Aventis)... 138

Figura I.1: Cromatografia de plasma diluído 1: 5 em PEVA-CM-Asp. Tampão de adsorção Tris-HCl 25mM a) pH 7,0, b) pH 8,0. M: marcador de alta massa molecular; I: injeção; L: lavagem; E: eluição por adição de NaCl 1 M ao tampão de adsorção; R: regeneração: NaOH 20 mM; P: IgG de alta pureza Aventis 142

Figura I.2: Cromatografia de plasma diluído 1: 5 em PEVA-CM-Asp. Tampão de adsorção Mops 25mM pH 7,5. M: marcador de alta massa molecular; I: injeção; L: lavagem; E: eluição por adição de NaCl 1 M ao tampão de adsorção; R: regeneração, NaOH 20 mM; P: IgG de alta pureza Aventis 142

Figura K.1: Grafico de Scatchard para os dados de adsorção de IgG humana em pré-purificada em presença do tampão Tris-HCl 25 mM pH 7,0 em membranas de PEVA-IDA-Ni(II) (○) 4°C ($R^2 = 0,52$), (Δ) 15 °C ($R^2 = 0,56$), (◐) 25°C ($R^2 = 0,81$), (●) 37°C ($R^2 = 0,84$) 145

Figura K.2: Grafico de Scatchard para os dados de adsorção de IgG humana em pré-purificada em presença do tampão Tris-HCl 25 mM 1 M NaCl pH 7,0 em membranas de PEVA-IDA-Ni(II): (○) 4°C ($R^2 = 0,44$), (Δ) 15°C ($R^2 = 0,64$), (◐) 25°C ($R^2 = 0,58$), (●) 37°C ($R^2 = 0,79$) 145

Figura L.1: Cromatografia de plasma diluído 1: 5 em Agarose-Proteína A utilizando-se o tampão de adsorção fosfato de sódio 25 mM pH 7,0. M - marcador de alta massa molecular; I - injeção; L- lavagem; E - eluição; P: IgG de alta pureza Aventis 146

Figura L.2: Cromatografia de plasma diluído 1: 5 em Agarose-Proteína G utilizando-se o tampão de adsorção Fosfato de sódio 25 mM pH 7,0. M - marcador de alta massa molecular; I - injeção; L- lavagem; E - eluição; P: IgG de alta pureza Aventis 146

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1: Principais proteínas do plasma humano	9
Tabela 2.2: Agentes quelantes utilizados em IMAC	18
Tabela 2.3: Fatores de estabilidade quelato	19
Tabela 2.4: Purificação de anticorpos por IMAC	23
Tabela 2.5: Purificação de imunoglobulinas G através de ligantes imobilizados em membranas	27
Tabela 3.1: Especificações da Sepharose 6B.....	30
Tabela 3.2: Especificações da membrana de PEVA	31
Tabela 3.3: Soluções tamponantes empregadas nos experimentos cromatográficos	38
Tabela 4.1: Densidade de metal e capacidade de adsorção de IgG dos adsorventes estudados	48
Tabela 4.2: Densidade dos íons metálicos cobre e níquel imobilizados em matrizes derivatizadas com agentes quelantes IDA, TREN e CM-Asp	49
Tabela 4.3: Adsorção de IgG em matrizes AQ-Cu(II)	52
Tabela 4.4: Proteína total e IgG adsorvida nas cromatografias realizadas com diferentes sistemas tamponantes.	60
Tabela 4.5: Purificação para IgG a partir do plasma humano em PEVA-TREN-Ni(II). Tampão de adsorção: MA 25 mM, NaCl 1 M pH 7,0	64
Tabela 4.6: Purificação para IgG a partir do plasma humano em PEVA-IDA-Ni(II). Tampão de adsorção: Tris-HCl 25 mM pH 7,0	66
Tabela 4.7: Purificação para IgG a partir do plasma humano em PEVA-CM-Asp-Ni(II). Tampão de adsorção: Tris-HCl 25 mM pH 7,0	68
Tabela 4.8: Balanço de massa para proteína total para a purificação de IgG a partir de plasma humano utilizando tampão de adsorção Tris-HCl 25 mM, pH 7,0 e dessorção por gradiente de grau de Tris em agarose-IDA-Ni(II) e agarose-CM-Asp-Ni(II)	71

Figura 4.9: Balanço de massa para proteína total para a purificação de IgG a partir de plasma humano utilizando tampão de adsorção MA 25 mM NaCl 1 M pH 7,0 e dessorção por gradiente de pH em agarose-TREN-Ni(II)	72
Tabela 4.10: Purificação para IgG a partir do plasma humano em módulo contendo PEVA-TREN-Ni(II). Tampão de adsorção: MA 25 mM NaCl 1 M pH 7,0	78
Tabela 4.11: Purificação de IgG a partir do plasma humano em módulo contendo PEVA-IDA-Ni(II). Tampão de adsorção: Tris-HCl 25 mM pH 7,0	82
Tabela 4.12: Comparação entre os experimentos de adsorção realizados em PEVA-IDA-Ni(II) utilizando-se membranas finamente cortadas e membranas contidas em módulo	83
Tabela 4.13: Purificação de IgG a partir do plasma humano em módulo contendo PEVA-CM-Asp-Ni(II). Tampão de adsorção: Tris-HCl 25 mM pH 7,0	87
Tabela 4.14: Comparação entre os experimentos de adsorção realizados em PEVA-CM-Asp-Ni(II) utilizando-se membranas finamente cortadas e membranas contidas em módulo	88
Tabela 4.15: Parâmetros obtidos a partir do ajuste não linear do modelo de Langmuir aos dados de adsorção de IgG humana em membranas de PEVA-IDA-Ni(II), PEVA-TREN-Ni(II) e PEVA-CM-Asp-Ni(II)	90
Tabela 4.16: Parâmetros obtidos a partir do ajuste não linear do modelo de Langmuir-Freundlich aos dados de adsorção de IgG humana em membranas de PEVA-IDA-Ni(II) e PEVA-CM-Asp-Ni(II)	94
Tabela 4.17: Parâmetros obtidos a partir do ajuste não linear do modelo de Langmuir aos dados de adsorção de IgG humana em membranas PEVA-IDA-Ni(II) utilizando-se o tampão de adsorção Tris-HCl 25 mM pH 7,0	96
Tabela 4.18: Parâmetros obtidos a partir do ajuste não linear do modelo de Langmuir aos dados de adsorção de IgG humana em membranas PEVA-IDA-Ni(II) utilizando-se o tampão de adsorção Tris-HCl 25 mM contendo 1 M de NaCl a pH 7,0	97
Tabela 4.19: Parâmetros termodinâmicos para a adsorção de IgG em PEVA-IDA-Ni(II) em presença do tampão Tris-HCl 25 mM pH 7,0 contendo 0 M e 1 M de NaCl	98
Tabela 4.20: Parâmetros obtidos a partir do ajuste linear do modelo de Langmuir-Freundlich aos dados de adsorção de IgG humana em membranas de PEVA-IDA-Ni(II) utilizando-se o tampão Tris-HCl 25 mM em presença de 1 M e 0 M de NaCl	102

Tabela 4.21: Parâmetros obtidos a partir do ajuste linear do modelo de multicamada de Langmuir aos dados de adsorção de IgG humana em membranas de PEVA-IDA-Ni(II) utilizando-se o tampão Tris-HCl 25 mM em presença de 1 M e 0 M de NaCl.	103
Tabela 4.22: Balanço de massa para IgG, IgA, IgM, transferrina e albumina humana. Tampão de adsorção: Mops 25 mM, pH 7,0. Eluição: Mops 25 mM, pH 7,0, 1 M NaCl	107
Tabela 4.23: Balanço de massa para proteína total, IgG, IgA, IgM, transferrina e albumina humana. Tampão de adsorção: Mes 25 mM, pH 6,5. Eluição: Mes 25 mM, pH 6,5, 1 M NaCl	108
Tabela B.1: Balanço de massa para proteína total. Purificação de IgG a partir de plasma humano. Tampão de adsorção MA 25 mM, NaCl 1 M pH 7,0. Eluição: gradiente degrau de pH.	128
Tabela B.2: Balanço de massa para IgG e albumina humana. Purificação de IgG a partir de plasma humano. Tampão de adsorção: MA 25 mM, NaCl 1 M, pH 7,0. Eluição por gradiente degrau de pH	129
Tabela D.1: Balanço de massa para proteína total. Purificação de IgG a partir de plasma humano. Tampão de adsorção: Mops 25 mM, imidazol 2 mM, NaCl 1 M pH 7,0. Eluição: gradiente degrau de imidazol	132
Tabela D.2: Balanço de massa para IgG e albumina humana. Purificação de IgG a partir de plasma humano. Tampão de adsorção Mops 25 mM, 2 mM imidazol, NaCl 1 M pH 7,0. Eluição: gradiente degrau de imidazol	133
Tabela F.1: Balanço de massa para proteína total. Purificação de IgG a partir de plasma humano. Tampão de adsorção: Tris-HCl 25 mM, pH 7,0. Eluição: gradiente degrau de Tris	136
Tabela F.2: Balanço de massa para IgG e albumina. Purificação de IgG a partir de plasma humano. Tampão de adsorção: Tris-HCl 25 mM pH 7,0. Eluição: gradiente degrau de Tris	137
Tabela H.1: Balanço de massa para proteína total. Purificação de IgG a partir de plasma humano. Tampão de adsorção: Tris-HCl 25 mM, NaCl 1M, pH 7,0. Eluição: gradiente degrau de Tris	140
Tabela H.2: Balanço de massa para IgG e albumina humana. Purificação de IgG a partir de plasma humano. Tampão de adsorção: Tris-HCl 25 mM, NaCl 1M, pH 7,0. Eluição: gradiente degrau de Tris	141
Tabela J.1: Balanço de massa para proteína total, IgG, IgA, IgM, transferrina e albumina humana. Tampão de adsorção: Tris 25 mM, pH 7,0	

Tabela J.1: Balanço de massa para proteína total, IgG, IgA, IgM, transferrina e albumina humana. Tampão de adsorção: Tris 25 mM, pH 7,0	143
Tabela J.2: Balanço de massa para proteína total, IgG, IgA, IgM, transferrina e albumina humana. Tampão de adsorção: Tris 25 mM, pH 8,0	143
Tabela J.3: Balanço de massa para proteína total, IgG, IgA, IgM, transferrina e albumina humana. Tampão de adsorção: Mops 25 mM, pH 7,5. Eluição: Mops 25 mM, pH 7,5, 1 M NaCl	144
Tabela M.1: Balanço de massa para proteína total, IgG, IgA, IgM, transferrina e albumina humana. Adsorção em agarose-proteína A. Tampão de adsorção: fosfato 25 mM, pH 7,0. Eluição: glicina pH 3,0	147
Tabela M.2: Balanço de massa para proteína total, IgG, IgA, IgM, transferrina e albumina humana. Adsorção em agarose-proteína G. Tampão de adsorção: fosfato 25 mM, pH 7,0. Eluição: glicina pH 3,0	147

LISTA DE NOMENCLATURAS

- A – área superficial das membranas
- AH – Albumina humana
- AQ – agente quelante
- C^* – Concentração de soluto livre em solução no equilíbrio
- CM-Asp – Ácido aspártico carboxi-metilado
- EDTA – Ácido etilenodiamino tetracético
- IDA – Ácido iminodiacético
- IgG – Imunoglobulina G
- IgA – Imunoglobulina A
- IgM – Imunoglobulina M
- IMAC – Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados
- K_a – Constante de associação
- K_{AA} – Constante de associação proteína-proteína
- K_d – Constante de dissociação
- K_{dd} – Constante de dissociação proteína-proteína
- $K_{d(LF)}$ – Constante de dissociação aparente
- L – Comprimento das membranas
- M – massa de adsorvente
- n – Coeficiente de Langmuir-Freundlich
- PEVA – Álcool poli(etileno)vinílico
- Q^* – Quantidade de soluto adsorvido por massa ou volume de adsorvente
- Q_F – Vazão do filtrado
- Q_I – Vazão de alimentação
- Q_m – Capacidade máxima de adsorção
- R – Constante dos gases
- r_0 – Raio externo das membranas
- r_i – Raio interno das membranas
- T - Temperatura
- t_R – tempo de residência

TREN – Tris-2(aminoetil)amina

TRF – Transferrina

V – volume de solução

V_i – Volume intersticial das membranas

ΔH° – Variação de Entalpia padrão

ΔG° – Variação da Energia de Gibbs padrão

ΔS° – Variação de Entropia padrão

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

Cerca de 25 milhões de litros de plasma são coletados por ano no mundo para fracionamento, dos quais os principais produtos extraídos são albumina, os fatores anti-hemofílicos (Fator VIII e IX) e as imunoglobulinas. No ano de 2003 o mercado mundial de hemoderivados faturou o correspondente a 8 bilhões de dólares, sendo 28% correspondendo às imunoglobulinas. No século XXI as imunoglobulinas assumiram o papel preponderante dentre todos os outros hemoderivados provenientes do fracionamento do plasma humano, sobretudo porque a produção e a utilização dos fatores anti-hemofílicos recombinantes ganham cada vez mais atenção do mercado, substituindo o tradicional concentrado plasmático (Hahn, 2004; Anbio, 2006).

A produção de hemoderivados é restrita a poucos países, sendo os Estados Unidos (E.U.A.) o principal produtor. No Brasil a produção de hemoderivados se restringe, por enquanto, a uma única planta piloto (HEMOPE, Recife, PE) produzindo um único produto proveniente do fracionamento do plasma humano, a albumina, com uma produção atual de 600 Kg por ano. A necessidade de hemoderivados no Brasil, no ano de 2005, foi de 34 ton, 2,55 ton e 351 milhões de UI (Unidade Internacional) para albumina, imunoglobulina e fatores anti-hemofílicos, respectivamente. A necessidade brasileira contudo não é suprida, pelo menos nos serviços públicos de saúde em que há uma forte demanda reprimida sobretudo de imunoglobulina. As importações brasileiras em hemoderivados, em 2005, foram de aproximadamente 431 milhões de reais, sendo 37% deste valor correspondendo às imunoglobulinas (Anbio, 2006).

A imunoglobulina do isotipo G (IgG), de todos os hemoderivados, é aquela que vem tendo a maior utilização em todo o mundo com um consumo per capita de 70 g por mil habitantes em países como o Canadá e E.U.A. Como exemplos da utilização das IgGs em indicações terapêuticas podemos citar: o tratamento de imunodeficiências congênitas ou adquiridas (o paciente pode apresentar deficiência global ou de alguma subclasse de IgG:

IgG₁, IgG₂, IgG₃ ou IgG₄); deficiências seletivas de anticorpos, doenças auto-imunes, diversas doenças infecciosas e no tratamento de alguns tipos de câncer (ex. leucemia linfocítica crônica). Essas aplicações terapêuticas requerem, normalmente, grandes quantidades de IgG com alto grau de pureza (Burnouf, 1995, Anbio, 2006).

A IgG é normalmente obtida a partir do fracionamento do plasma humano pela precipitação com etanol de acordo com o procedimento descrito por Cohn *et al* 1946. No entanto, recentemente, métodos mais seletivos para a purificação de IgG, como por exemplo, métodos cromatográficos, são vistos pela indústria farmacêutica como uma operação indispensável antes da sua utilização no campo terapêutico, evitando, desta forma, efeitos colaterais nos pacientes e aumento da eficácia clínica. Técnicas cromatográficas de afinidade foram propostas para a purificação de imunoglobulinas as quais evitam a etapa de precipitação devido à alta especificidade do ligante acoplado a fase estacionária, proporcionando IgG com alto grau de pureza (< 90%). A cromatografia de afinidade vem apresentando resultados promissores nos processos de purificação de anticorpos (Huse *et al*, 2002).

Os ligantes de afinidade imobilizados a matrizes cromatográficas podem ser bioespecíficos ou pseudobioespecíficos. Os ligantes bioespecíficos, como proteína A e G, são amplamente utilizados na purificação de anticorpos, porém, apesar de serem altamente específicos, possuem a desvantagem de terem custo elevado, baixa estabilidade e a possibilidade de desnaturação do ligante nas etapas de eluição e regeneração da coluna. Os ligantes pseudobioespecíficos, tais como íons metálicos imobilizados surgiram como opção aos ligantes bioespecíficos por serem moléculas de mais baixo custo e simples.

A cromatografia de afinidade com íons metálicos imobilizados (IMAC - “Immobilized Metal ion Affinity Chromatography”) introduzida por Porath e colaboradores em 1975, vem sendo empregada para a purificação de anticorpos de diversas fontes (Porath e Olin, 1983; Boden *et al*, 1995, Hale e Beidler, 1994; Vançan *et al*, 2002). Esta técnica explora a interação entre os resíduos de histidina acessíveis na superfície da proteína e o íon metálico imobilizado (Porath *et al.*, 1975; Sulkowski, 1989). A interação destes resíduos com íons metálicos decorre da ligação de coordenação entre um par de elétrons do anel imidazol e o ligante: íon metálico quelatado à agentes quelantes (Porath e Olin, 1983).

A grande maioria dessas técnicas cromatográficas de afinidade utiliza géis como suporte cromatográfico e apesar de apresentarem resultados promissores, o uso de géis tradicionais apresenta algumas desvantagens, tais como alta queda de pressão na coluna cromatográfica e tempo de processamento elevado devido à difusão intrapartícula. Com o intuito de minimizar as limitações impostas pelos géis cromatográficos, várias estratégias de recuperação têm sido propostas. A cromatografia em membranas de afinidade (MAC “Membrane Affinity Chromatography”) tem sido utilizada como uma alternativa aos géis cromatográficos. Esse método possibilita alta capacidade hidrodinâmica, empregando-se pressões moderadas, na maioria das vezes sem comprometimento da eficiência da purificação. Nestes sistemas, a transferência de massa é governada principalmente pela convecção (Klein, 1991, Thömmes e Kula, 1995, Roper e Lightfoot, 1995, Charcosset, 1998).

Apesar das membranas de afinidade serem muito empregadas para a purificação de diversas proteínas, a literatura consultada registra poucos artigos publicados sobre purificação de imunoglobulina G empregando-se íons metálicos imobilizados a membranas. Além disso, os pesquisadores que utilizam esta técnica para a purificação de anticorpos empregam, preferencialmente, o agente quelante ácido iminodiacético (IDA) (Finger *et al.*, 1995; Langlotz e Kroner, 1992, Serpa *et al.*, 2005), tornando-se necessário o estudo da utilização de outros agentes quelantes nos processos de purificação e recuperação de imunoglobulinas. Estas informações nos motivaram a empregar a técnica de cromatografia em membranas de afinidade utilizando íons metálicos imobilizados para a purificação de IgG a partir do plasma humano, efetuando um estudo comparativo entre três agentes quelantes: ácido iminodiacético (IDA), ácido aspártico carboxi-metilado (CM-Asp) e Tris-2(aminoetil)amina (TREN).

Objetivo

O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito de agentes quelantes tetradentados (CM-Asp e TREN) na purificação de imunoglobulina G a partir do plasma humano utilizando a técnica de cromatografia de afinidade com os íons metálicos imobilizados em

membranas de fibras ocas. Para que esse objetivo pudesse ser atingido, foram realizadas as seguintes etapas:

1) Ativação de membranas de fibra oca de álcool polietilenovínico (PEVA) e imobilização dos agentes quelantes IDA, CM-Asp e TREN. O agente quelante IDA foi utilizado como controle;

2) Experimentos cromatográficos para a purificação de IgG a partir do plasma humano em membranas de afinidade finamente cortadas, com o intuito de verificar o perfil de eluição da imunoglobulina e determinar as condições ótimas de eluição;

3) Determinação de curvas de ruptura (“breakthrough”) das membranas contidas em módulo em escala laboratorial. As curvas de ruptura permitem determinar a capacidade dinâmica das membranas de afinidade (parâmetro importante no escalonamento do processo);

4) Determinação das isotermas de adsorção a várias temperaturas por meio de ensaios em tanques agitados, utilizando membranas derivatizadas e IgG pré-purificada para a determinação da constante de dissociação (K_d) do complexo agente quelante-Me(II)-IgG, da capacidade máxima de adsorção (Q_m) de IgG nas membranas e de parâmetros termodinâmicos (ΔG° , ΔH° e ΔS°);

5) Experimentos cromatográficos para a purificação de IgG a partir do plasma humano utilizando-se o agente quelante CM-Asp como ligante.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo são apresentados tópicos de conhecimentos básicos para a compreensão do trabalho. A revisão bibliográfica está dividida em quatro partes: imunoglobulinas humanas: estrutura e função, purificação de IgG, cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (técnica de IMAC) e cromatografia em membranas de afinidade.

2.1 IMUNOGLOBULINAS HUMANAS: ESTRUTURA E FUNÇÃO

O sistema imunológico consiste de dois componentes funcionais: o sistema inato e o sistema adaptativo. O sistema inato é composto por todos os mecanismos que defendem o organismo de forma não específica contra um invasor por meio de fagócitos (ex: macrófagos, neutrófilos e etc) e barreiras físicas (ex: pele, mucosa, saliva, e outros). Quando essa barreira de defesa é quebrada o sistema adaptativo imune entra em ação. O sistema adaptativo imune produz uma reação específica contra o agente nocivo normalmente eliminando-o e ainda desenvolve uma memória imunológica específica que previne uma possível re-infecção pelo mesmo agente nocivo. O sistema adaptativo imune consiste de uma variedade de moléculas e células no qual a imunoglobulina e os linfócitos são os mais importantes. Existem dois tipos de linfócitos: as células T e células B. As células T são responsáveis pela imunidade celular, enquanto as células B estão envolvidas na imunidade humoral. Após a exposição aos antígenos, as células B se diferenciam em células plasmáticas que sintetizam moléculas que reagem ao antígeno: as imunoglobulinas (Vlug e Remortel, 1989). As imunoglobulinas têm papel importante na resposta imune humana no reconhecimento de substâncias estranhas ao organismo

As imunoglobulinas pertencem ao grupo das glicoproteínas e são compostas de 82% a 96% de proteínas e 4 a 18% de carboidratos. A estrutura básica da imunoglobulina consiste de quatro cadeias polipeptídicas: duas cadeias pesadas (H), cuja massa molecular varia de 50.000 a 70.000 Daltons, e duas cadeias leves (L), de massa molecular de 25.000 Daltons. As quatro cadeias são mantidas juntas por ligações dissulfídicas (Vlug e Remortel, 1989).

As enzimas proteolíticas papaína e pepsina clivam as imunoglobulinas em diferentes fragmentos característicos. A papaína produz dois fragmentos Fab (*ab*, “antigen-binding”) idênticos, cada um contendo um sítio ligador do antígeno e um fragmento Fc (*c*, “cristalizado”). A pepsina produz um fragmento F(ab')₂ (constituído de dois fragmentos F(ab) ligados covalentemente) e o restante da molécula é quebrada em fragmentos menores (Figura 2.1).

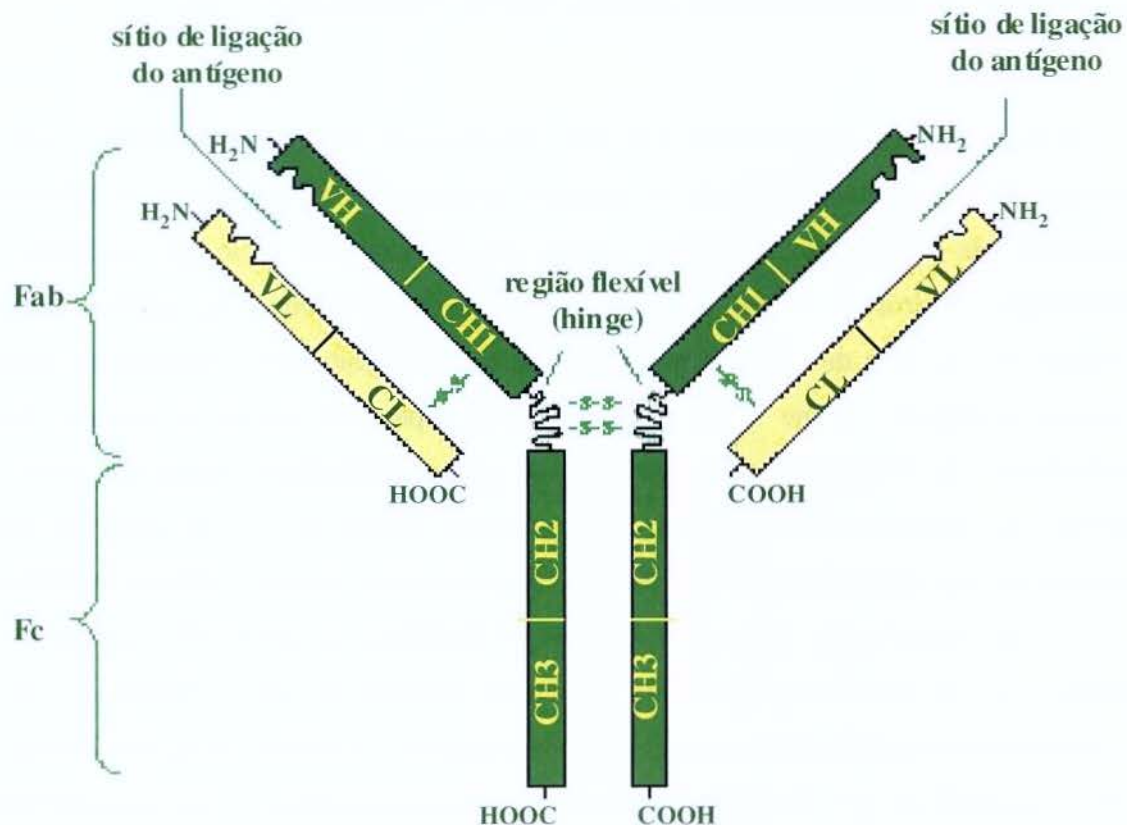


Figura 2.1: Estrutura da imunoglobulina (IgG) (adaptado de Alberts *et al*, 1997)

■ cadeia pesada, ■ cadeia leve

As cadeias leves que fazem parte da região Fab, podem ser do tipo κ ou λ e são formadas por dois domínios, um variável (V_L) e outro constante (C_L) (Figura 2.1). As cadeias pesadas são características dos tipos de imunoglobulinas que se diferem a partir da estrutura das cadeias pesadas: IgG (γ), IgM (μ), IgA (α), IgD (δ) e IgE (ϵ). As cadeias pesadas possuem uma parte variável (V_H) e três partes constantes C_{H1} , C_{H2} e C_{H3} , sendo que as IgM e IgE possuem um domínio constante extra (C_{H4}). Os domínios variáveis das cadeias leve e pesadas, as regiões V, constituem os sítios ligadores de antígeno e as regiões C funcionam para estruturar a molécula e estão envolvidas em diferentes atividades biológicas, tais como ligação de complemento e ligação a membranas celulares. A maioria das imunoglobulinas humanas possui uma região flexível (“dobradiça”) entre a região Fab e entre os domínios C_H da cadeia pesada. Uma função importante da região flexível (“dobradiça”) é promover flexibilidade a imunoglobulina. (Vlug e Remortel, 1989).

Baseado em diferenças biológicas, antigênicas e da estrutura na cadeia pesada, cinco classes de imunoglobulina pode ser distinguidas no soro humano (Alberts *et al*, 1997):

IgE (ϵ): presente em quantidades ínfimas no soro, pode estar associada a reações alérgicas (massa molecular de 190 kDa). Está presente no soro humano sob a forma de monômero;

IgD (δ): corresponde a menos de 1% do total de imunoglobulinas séricas, está presente no soro humano sob a forma de monômero (massa molecular próxima de 180 kDa). Sua função biológica ainda não é muito bem conhecida, mas provavelmente tem um papel importante como receptor para antígenos na superfície das células B;

IgA (α): Corresponde de 15 a 20% do total de imunoglobulinas séricas (massa molecular de 160 kDa em forma de monômero). É a principal classe de anticorpos nas secreções (saliva, lágrima, leite e etc), desempenha um papel importante na defesa do corpo quando se verifica a invasão de microorganismos através de uma membrana mucosa e está presente no soro humano usualmente em forma de dímero. As IgAs são divididas em duas sub-classes IgA₁, IgA₂.

IgM (μ): corresponde a 10% do total de imunoglobulinas séricas e atua no início da resposta imune (massa molecular próxima de 900 kDa). Está presente no soro humano usualmente em forma de pentâmero;

IgG (γ): corresponde de 70 a 75% do total de imunoglobulinas séricas, normalmente produzida nos últimos estágios da resposta imune. Está presente no soro humano usualmente em forma de monômero (massa molecular em torno de 150 kDa).

As IgGs são divididas em quatro subclasses designadas: IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄ e são diferenciadas, principalmente, pela região flexível (“dobradiça”) em termos de números de resíduos envolvidos e número de pontes dissulfeto inter-cadeias pesadas. As subclasses de IgG possuem pontos isoelétricos (pI) distintos: IgG₁ e IgG₃ possuem pI mais altos (de 7,8 a 9,0) que os da IgG₂ e IgG₄ (de 6,3 a 8,0) (Vlug e Van Remortel, 1989). As concentrações relativas das subclasses no soro humano variam de 68-71% para IgG₁, 19-31% para IgG₂, 4-8% para IgG₃ e 1-7% para IgG₄.

2.2 PURIFICAÇÃO DE IgG

Uma variedade de técnicas tem sido investigada para a purificação de imunoglobulinas a partir do plasma humano. A escolha da metodologia apropriada para a purificação de imunoglobulina depende do rendimento e pureza requeridos, assim como do custo do procedimento. Compostos destinados a aplicações terapêuticas e em testes diagnósticos, requerem alto grau de pureza e necessitam de técnicas de purificação mais seletivas. Várias técnicas são utilizadas para a purificação de anticorpos como precipitação, cromatografia de permeação em gel, de troca iônica e de afinidade (Gagnon, 1994)

A purificação da IgG humana consiste da separação desta proteína das outras constituintes do plasma ou do soro humano. A albumina é a mais abundante das proteínas do plasma humano, seguido das γ -globulinas (IgG). A Tabela 2.1 apresenta as concentrações plasmáticas das principais proteínas do plasma humano.

Tabela 2.1: Principais proteínas do plasma humano¹

Proteína	Massa Molecular (kDa)	Concentração plasmática (mg/mL)
Albumina	66,3	35 a 55
α_1 -Lipoproteínas (HDL)	2000	2,9 a 7,7
β -Lipoproteínas (LDL)	170	1,9 a 7,4
α_1 – Antitripsina	54,0	2 a 4
Transferrina	76,5	2 a 4
Fibrinogêneo	341	2 a 4,5
Haptoglobulina	100-400	3,8 a 7,8
α_2 – Macroglobulina	725	1,5 a 4,2
IgG	150	8 a 18
IgM	900	0,6 a 2,5
IgA	160	0,9 a 4,5

¹Referência: Andrade e Hlady, 1987.

O método mais usado para isolar a IgG a partir do plasma humano para uso clínico, consiste da precipitação com etanol, de acordo com o procedimento descrito por Cohn *et al* 1946. Por esse método, obtém-se IgG contaminada com pequenas quantidades de albumina (normalmente 0,5%) e outras proteínas presentes no plasma em menores concentrações. Dessa forma, métodos mais seletivos (cromatográficos) para a purificação de IgG, é vista pela indústria farmacêutica como uma operação indispensável antes da utilização dessas proteínas no campo terapêutico.

A cromatografia de troca iônica e a precipitação com polietilenoglicol são, igualmente, métodos comumente utilizados para a purificação de anticorpos policlonais e monoclonais. Esses métodos, porém, também não apresentam alta seletividade e passos adicionais no processo de purificação, como cromatografia de permeação em gel, tornam-se necessários

para se alcançar o grau de pureza requerido. Essa desvantagem aumenta o tempo de processamento e o rendimento global de purificações multi-passos acaba sendo baixo, aumentando o custo do processo (Huse *et al*, 2002).

A técnica da cromatografia de afinidade vem sendo desenvolvida para utilização na purificação de anticorpos de diferentes fontes por ser um processo altamente seletivo. A introdução da cromatografia de afinidade tem melhorado significativamente a pureza dos hemoderivados de um modo geral e conseqüentemente, os efeitos colaterais (hemólise, hipotensão, febre) associados ao uso clínico podem ser minimizados. Essa técnica pode evitar ainda, etapas adicionais de purificação. Purificações em uma única etapa, geralmente, possibilitam maior rendimento, minimizando perdas causadas por clivagem proteolítica ou pela clivagem de ligações dissulfeto (liberação de cadeias leves e pesadas no meio) (Huse *et al*, 2002).

Cromatografia de Afinidade para purificação de IgG humana

A cromatografia de afinidade foi utilizada pela primeira vez em 1910 por Stankein. Contudo, somente em 1967 que esse tipo de cromatografia tomou impulso com o desenvolvimento do método de imobilização de ligantes numa matriz de agarose por meio da ativação com brometo de cianogênio (Porath *et al*, 1967; Axen *et al*, 1967; Turskova, 1993; Sada, 1990). O uso da cromatografia de afinidade para purificação de anticorpos avançou com o desenvolvimento da técnica da produção de anticorpos monoclonais e da necessidade desses estarem a um alto grau de pureza para testes imunodiagnósticos, aplicações terapêuticas e outras (Huse *et al*, 2002).

A cromatografia de afinidade é uma técnica de adsorção baseada na habilidade de substâncias se ligarem especificamente e reversivelmente a substâncias complementares, os ligantes. Os ligantes devem estar imobilizados à uma matriz cromatográfica. A técnica da cromatografia pode ser dividida em quatro etapas: injeção ou adsorção de moléculas, lavagem, eluição e regeneração do adsorvente. A adsorção das moléculas representa o primeiro passo de separação, as moléculas que possuem afinidade pelo ligante são adsorvidas, enquanto que as outras moléculas não adsorvidas são removidas pela lavagem

do adsorvente em um segundo passo. A eluição ou dessorção representa o terceiro passo e é realizada pela mudança das condições da fase móvel, como pH, força iônica, adição de agentes competidores e outros. O quarto passo consiste na regeneração do adsorvente, onde as moléculas fortemente adsorvidas que não foram eluídas na etapa de dessorção, são eluídas, muitas vezes sob condições drásticas, deixando o adsorvente pronto para ser reutilizado (Walters, 1985, Vijayalakshmi, 1989).

Os ligantes empregados em cromatografia de afinidade são classificados, segundo Vijayalakshmi (1989), em dois tipos: bioespecíficos e pseudobioespecíficos. A Figura 2.2 mostra a classificação desses ligantes.

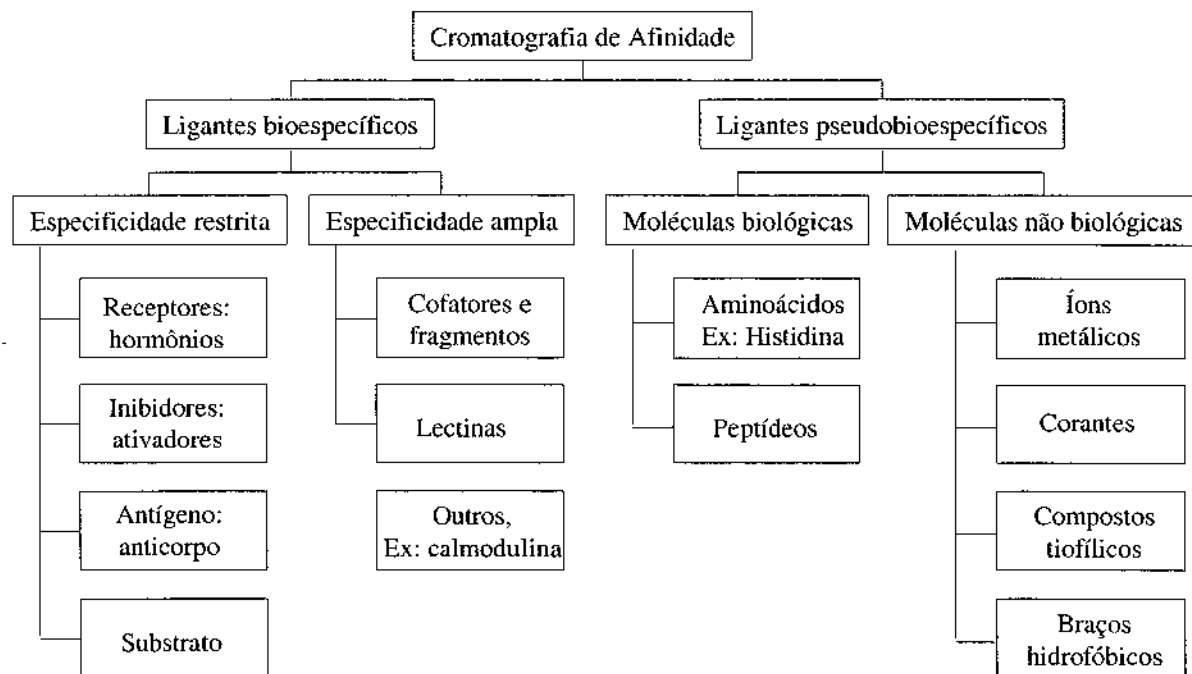


Figura.2.2: Classificação do sistema de afinidade baseado nos ligantes imobilizados (adaptado de Vijayalakshmi, 1989)

Os ligantes bioespecíficos possuem a vantagem de serem altamente específicos e de terem afinidade alta pela molécula a ser adsorvida, as constantes de dissociação são da ordem de 10^{-6} a 10^{-12} M. Porém, possuem a desvantagem de terem um custo elevado, baixa estabilidade e a possibilidade de desnaturação do ligante nas etapas de eluição e de

regeneração da coluna, já que muitas vezes são necessárias condições drásticas para a eluição em cromatografia de afinidade envolvendo ligantes bioespecíficos.

A cromatografia de afinidade com os ligantes bioespecíficos proteínas A, G e L é empregada para a purificação de anticorpos de diversas fontes, sendo que as proteínas A e G são utilizadas ainda para tratamento extracorpóreo (por exemplo, para remoção de auto-anticorpos de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico). A proteína A, secretada pela maioria das linhagens de bactérias *Staphylococcus aureus*, apresenta alta afinidade pela parte Fc das imunoglobulinas humanas IgG₁, IgG₂, e IgG₄ e ainda apresenta afinidade média pela IgA e IgM humana (Burton, 1985; Burton *et al*, 1986). Porém, a proteína A não apresenta afinidade pela subclasse IgG₃ humana (Loghem, 1982). Esses resultados sugerem que a histidina na posição 435 tem um papel fundamental na adsorção de IgG à proteína A. Todas as IgGs que se ligam à proteína A possuem a histidina na posição 435, enquanto as IgGs humanas que não se ligam possuem arginina nesta posição. No caso de anticorpos de camundongo, a proteína A apresenta pouca afinidade pela subclasse IgG₁ enquanto para as subclasses IgG_{2a}, IgG_{2b} e IgG₃ possui afinidade média (Boyle *et al*, 1987, Boyle *et al*, 1993).

A proteína G (isolada das linhagens do grupo *G Streptococcal*), também muito utilizada para a purificação de anticorpos, apresenta afinidade por todas as subclasses de IgG humana, ligando-se também à parte Fc e também a Fab da IgG (Erntell *et al*, 1988). Essa proteína não apresenta afinidade pelas outras classes de imunoglobulinas humana: IgA, IgM, IgE, e IgD. A proteína G apresenta, ainda, afinidade média por anticorpos de camundongos da subclasse IgG₁ e alta afinidade pelas subclasses IgG_{2a}, IgG_{2b} e IgG₃ (Boyle *et al*, 1987).

A proteína L, isolada da bactéria *Peptostreptococcus magnus*, foi identificada em 1985 por Myhre e Erntell e tem afinidade pelas cadeias leves do tipo kappa das imunoglobulinas. Essa proteína é empregada como ligante na purificação de IgG e seus fragmentos Fv e Fab, sem interferir no sítio de ligação antígeno-anticorpo. A proteína L foi utilizada, também, para estudos *in vitro* visando o tratamento extracorpóreo de doenças auto-imunes na remoção de IgG de cadeia leve kappa (Nilson *et al*, 1993; Duarte *et al*, 2005).

Contudo, apesar destes ligantes bioespecíficos apresentarem bons resultados de purificação, como a eluição das biomoléculas é realizada sob condições de pH extremos, a contaminação do produto com traços do ligante devido à hidrólise ou desprendimento destes, representa um sério problema para soluções protéicas destinadas a aplicação terapêutica. Além disso, a sanitização sob condições drásticas pode inativar com o tempo estes ligantes, levando à perda da capacidade de adsorção. Em adição, o alto custo desta técnica torna impraticável o seu uso em larga escala (Anspach *et al*, 1996; Hale e Beidler, 1994). Até o momento, as proteínas A, G e L não vêm sendo utilizadas nos processos industriais de fracionamento do plasma humano para a purificação de IgG devido as desvantagens apresentadas (Burnouf e Radosevich, 2001).

Para contornar os problemas inerentes dos ligantes bioespecíficos, ligantes mais simples, os pseudobioespecíficos vêm sendo usados na purificação de imunoglobulinas. Esses tipos de ligantes possuem a vantagem de terem baixo custo e facilidade de escalonamento, de serem moléculas menores e mais simples, de terem estabilidade química e física mais alta do que os bioespecíficos e apresentarem condições brandas de eluição (as constantes de dissociação são da ordem de 10^{-2} a 10^{-6} M). Porém, possuem a desvantagem de terem especificidade menor. As forças de interação entre o ligante imobilizado e a molécula a ser separada é baseada na complementaridade de carga, de hidrofobicidade e forma, a diferença entre os bioespecíficos e pseudobioespecíficos está na magnitude dessas forças.

Dentre os ligantes pseudobioespecíficos disponíveis, os íons metálicos imobilizados, o aminoácido histidina e os agentes tiofílicos são alguns dos ligantes mais utilizados nos processos de purificação de imunoglobulinas.

O aminoácido histidina é utilizado como ligante pseudobioespecífico em cromatografia para a purificação de IgG (El-Kak e Vijayalakshmi, 1992; Bueno *et al*, 1995 (a); Çanak *et al*, 2004). A histidina tem muitas propriedades que conferem a este aminoácido versatilidade como ligante, que são hidrofobicidade branda, habilidade de transferência de carga e ataque nucleofílico devido ao seu anel imidazol (Vijayalakshmi, 1989). Essas propriedades sugerem que a histidina, quando imobilizada em suportes sólidos, possa interagir com proteínas de várias formas, dependendo de condições como pH, temperatura, força iônica empregados e orientação da imobilização (Vijayalakshmi, 1989). Histidina

imobilizada pelo de seu grupamento amino interage com a região Fab das imunoglobulinas, adsorvendo preferencialmente IgG₁ e IgG₃, quando Tris-HCl é utilizado como tampão de adsorção (Bueno *et al*, 1995 (b); Bueno *et al*, 1996; Haupt *et al*, 1995). Por outro lado, histidina imobilizada pelo seu grupo carboxila apresenta carga líquida positiva, devido ao agrupamento amino livre, em ampla faixa de pH. Imobilizada desta forma, resultados de purificação excelentes podem ser obtidos pela da utilização da técnica de cromatografia negativa. A carga positiva do ligante promove a adsorção da maioria das proteínas do plasma, enquanto as IgGs, por não interagirem com histidina orientada desta forma, são obtidas com alto grau de pureza nas frações não retidas (Pitiot *et al*, 2001). A histidina vem sendo imobilizada em diversas matrizes para a purificação de IgG com o intuito de aumentar a capacidade e seletividade (Çanak *et al*, 2004).

A cromatografia tiofílica foi introduzida por Porath e colaboradores em 1985. Os agentes tiofílicos (ligantes que contém o grupo -SH imobilizados em suportes ativados com divinilsulfona ou epícloridrina) são moléculas simples e de baixo custo que tem a especificidade por imunoglobulinas, conferindo a estas, a possibilidade de purificação a partir de sobrenadante de cultura celular ou amostras séricas. A afinidade entre ligantes tiofílicos e imunoglobulinas, promovida ou não em presença de sais, é baseada na interação entre regiões tiofílicas das proteínas com o grupo sulfona ou tioéter de adsorventes tiofílicos. O adsorvente mais comumente utilizado na cromatografia tiofílica é o “T-gel” (2-mercaptoetanol como ligante) (Hutchens e Porath, 1986, Hutchens e Porath, 1987, Nooper *et al*, 1989, Serres *et al*, 1995). Os dois grupos funcionais, sulfona e tioéter, presentes na estrutura do adsorvente, atuam de maneira cooperativa (grupos que funcionam como receptores de elétrons de grupamentos doadores de elétrons da proteína), exercendo forte afinidade com a proteína quando em presença de alta concentração de sal (sulfato de amônio e sulfato de sódio). Mais recentemente, Scholz *et al*, 1998 descreveram outras possibilidades de ligantes tiofílicos, os ligantes tiofílicos heterocíclicos, que não requerem a presença de sal para a adsorção (Scholz *et al*, 1998, Coffinier e Vijayalakshmi, 2004). Desta forma, o baixo custo, estabilidade química e especificidade fizeram destes ligantes uma alternativa promissora para a purificação de anticorpos policlonais e monoclonais (Coffinier *et al*, 2002, Oscarsson e Porath, 1989, Finger *et al*, 1995, Boschetti, 2001).

A cromatografia de afinidade com íons metálicos imobilizados (IMAC - “Immobilized Metal Affinity ion Chromatography”), é empregada para a purificação de anticorpos de diferentes fontes (Porath e Olin, 1983; Boden *et al*, 1995, Hale e Beidler, 1994; Vançan *et al*, 2002). Os resultados mostrados na bibliografia consultada para a purificação de anticorpos utilizando IMAC mostram um grande potencial de utilização desta técnica. O princípio da técnica de IMAC é descrito na secção 2.3.

2.3 CROMATOGRAPHIA DE AFINIDADE COM ÍONS METÁLICOS IMOBILIZADOS (IMAC)

Introduzida por Porath e colaboradores em 1975, a cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC – “Immobilized Metal ion Affinty Chromatography”) é uma técnica de separação que utiliza o princípio da afinidade de proteínas por íons metálicos imobilizados. Essa afinidade deriva, principalmente, das ligações de coordenação formadas entre os íons metálicos quelatados e certos resíduos de aminoácidos expostos à superfície da proteína. A técnica foi inicialmente desenvolvida para fracionamento de proteínas e é atualmente aplicada à purificação de uma grande variedade de biomoléculas (peptídeos, proteínas, ácidos nucleicos e para separação de células) (Chaga, 2001; Porath e Olins, 1983; Gaberc-Porekar e Menart, 2001).

Na técnica de IMAC, o centro de adsorção consiste de dois componentes: o agente quelante e o íon metálico imobilizado. O agente quelante é imobilizado na matriz via um espaçador por meio de ligações covalentes. Os átomos doadores de elétrons (N, S, O) presentes nos agentes quelantes que são acoplados ao suporte cromatográfico, são capazes de coordenar os íons metálicos formando quelatos metálicos. Os sítios de coordenação restantes do íon metálico são normalmente ocupados por moléculas de água, que podem ser trocadas por grupos doadores de elétrons da proteína (Porath *et al*, 1975; Chaga, 2001).

A adsorção de proteínas é baseada na ligação de coordenação entre um íon metálico quelatado e grupos doadores de elétrons na superfície da proteína, porém os efeitos combinados de interações eletrostática e hidrofóbica também participam da retenção da proteína. Apesar de vários grupos funcionais da proteína, como cadeias laterais da

glutamina, aspartato, tirosina, cisteína, histidina, arginina, lisina, metionina e os terminais amino e o grupamento carboxila, participarem na interação, a retenção em IMAC é baseada primeiramente na disponibilidade de resíduos histidina (Porath *et al*, 1975), seguido pela cisteína e em menor proporção pelo triptofano. Em associações envolvendo histidina, o nitrogênio do anel imidazol sob a sua forma desprotonada, geralmente em torno de pH neutro, é o grupo doador de elétrons para a coordenação com o metal. O papel de um aminoácido no processo de adsorção por IMAC não é o mesmo para todas as proteínas. Diferenças nos pK's e o posicionamento dos aminoácidos causam variação na ordem de retenção da proteína pela matriz.

A seletividade da separação de proteínas pode ser afetada por vários fatores: escolha do íon metálico a ser imobilizado, variações na estrutura nos agentes quelantes, variações no braço espaçador, densidade de ligantes, concentração de sais e de agentes competidores dentre outros.

2.3.1 Seleção do íon metálico e do agente quelante

Em princípio, todos os metais suscetíveis de interagir com proteínas podem ser utilizados em IMAC. No entanto, Fe(III), Co(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II), Al(II) e Ca(II) são os íons metálicos mais utilizados. Os íons metálicos de transição Cu(II), Zn(II), Co(II), Ni(II) coordenam preferencialmente bases de Lewis intermediárias e fracas a fim de se obter um quelato com maior estabilidade (Wong *et al*, 1991). Esses metais são conhecidos por apresentarem interação com o nitrogênio aromático dos grupamentos imidazol e indol (histidina e triptofano, respectivamente), classificados como bases intermediárias e com o enxofre do grupamento tiol da cisteína, classificado como base fraca.

Os íons metálicos Fe(III) e Al(III) são utilizados para separar fosfoproteínas. O íon Ca(II), por formar ligações de coordenação estáveis com moléculas que contenham oxigênio, pode ser selecionado para separação de proteínas contendo grupamentos carboxílicos (resíduos glutamato e aspartato) (Mantovaara *et al*, 1991; Chaga *et al*, 1999).

A análise da retenção de peptídeos e proteínas modelo em adsorventes derivatizados com IDA-Cu(II), IDA-Ni(II), IDA-Zn(II) e IDA-Co(II) mostrou forte afinidade desses géis

pelos resíduos histidina acessíveis presentes nessas proteínas e peptídeos. Sulkowski, em 1989, estabeleceu regras que governam a interação histidina-IDA-Cu(II), -Ni(II), -Zn(II) e -Co(II):

- (a) a presença de pelo menos um resíduo histidina disponível para a coordenação é suficiente para a retenção da mesma em um gel de IDA-Cu(II);
- (b) a presença de dois resíduos histidina disponíveis para a coordenação resulta em uma retenção mais forte da proteína em um gel de IDA-Cu(II);
- (c) a presença de dois resíduos histidina disponíveis para a coordenação é requerida para a retenção em um gel de IDA-Ni(II);
- (d) a presença de dois resíduos histidina espacialmente localizadas em uma α -hélice e separadas por dois ou três aminoácidos é requerida para a retenção em géis de IDA-Zn(II) e de IDA-Co(II).
- (e) a retenção de uma proteína que possui dois resíduos histidina vicinais (efeito quelato) será mais forte, em todos os géis IDA-Me(II), que a retenção de uma proteína que possui dois resíduos histidina bem espaçados na estrutura tridimensional.

Como resultado, pode-se determinar que a força de retenção das proteínas em gel IDA-Me(II) seguia a seguinte ordem: Cu(II) > Ni(II) > Zn(II) = Co(II).

As propriedades do centro de adsorção dependem fortemente do agente quelante. Os agentes quelantes podem ser bidentados, tridentados, etc, dependendo do número de ligações de coordenação que formam com o íon metálico. Em geral, quanto mais polidentado for o agente quelante, mais estáveis são os quelatos formados entre o suporte e os íons metálicos, porém, mais fraca a interação do metal com a proteína. Alguns dos agentes quelantes utilizados em IMAC estão apresentados na Tabela 2.2.

Tabela 2.2 Agentes quelantes utilizados em IMAC (Gaberc-Porekar e Menart, 2001)

Agente Quelante	Coordenação
Ácido aminohidroxâmico	Bidentado
Salicilaldeído	Bidentado
8-hidroxi-quinolina (8-HQ)	Bidentado
Ácido iminodiacético (IDA)	Tridentado
Dipicolamida (DPA)	Tridentado
Orto-fosfoserina (OPS)	Tridentado
N-(2-piridilmetil) aminoacetado	Tridentado
2,6-Diaminometilpiridina	Tridentado
Ácido nitrilo tri-acético (NTA)	Tetradentado
Ácido aspártico carboximetilado (CM-Asp)	Tetradentado
Tris-2(aminoetil)amina (TREN)	Tetradentado
N,N,N'-tris-carboximetil-etilenodiamina (TED)	Pentadentado

A estabilidade do quelato depende, ainda, dos anéis quelato formados entre os átomos do agente quelante e o metal. A Figura 2.3 representa os anéis quelato formado entre o íon metálico e os átomos dos agentes quelantes IDA, NTA, CM-Asp, TED e TREN, onde os traçados em diferentes cores representam cada anel quelato. O número de átomos envolvidos na formação de cada anel quelato determina a estabilidade do complexo metálico, sendo desta forma recomendável selecionar um quelante que forme anéis quelato contendo um número máximo de cinco a seis átomos. Números maiores de átomos pode dificultar a formação dos anéis quelatos devido à mobilidade estérica (Tabela 2.3) (Porath e Olin, 1983).

Os átomos doadores de elétrons (em geral O ou N) que participam da coordenação com o metal também influenciam na estabilidade quelato. Átomos de oxigênio dos grupamentos carboxílicos dos agentes quelantes são mais estáveis em pHs ácidos (superiores a 4,0) que átomos de nitrogênio, estes mais susceptíveis à protonação em baixos pHs.

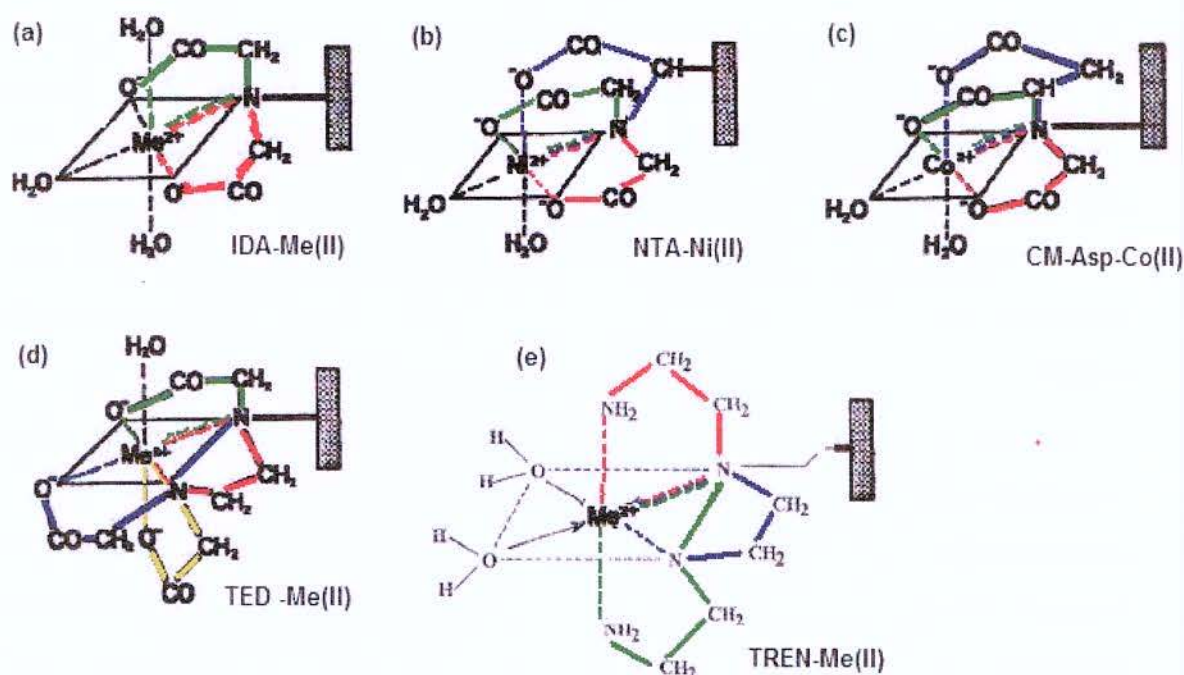


Figura 2.3: Representação esquemática dos complexos de íons metálicos quelatados (adaptado de Gaberc-Porekar e Menart, 2001 e Sharma e Argawal, 2001)

Tabela 2.3: Fatores de estabilidade quelato (adaptado de Porath, 1988)

Agente quelante	Número de átomos que participam da coordenação com o metal		Número de anéis quelato	
	Nitrogênio	Oxigênio	5 átomos	6 átomos
IDA	1	2	2	0
NTA	1	3	3	0
CM-Asp	1	3	2	1
TREN	4	0	3	0
TED	2	3	4	0

O agente quelante mais utilizado é o ácido iminodiacético (IDA), que é um quelante tridentado (Hale e Bailder, 1995; Vançan *et al*, 2002; Porath e Olins, 1983, Porath *et al*, 1975). Por ser tridentado, para íons metálicos hexacoordenados, há disponibilidade de três

sítios de interação do metal com a proteína. O IDA apresenta dois grupamentos carboxila e um nitrogênio em sua estrutura para coordenação com o metal, formado dois anéis quelato contendo cinco átomos cada um (Tabela 2.3). Os pKs dos grupamentos carboxilas do IDA são inferiores a 3,0 (Bossi e Righetti, 1997) e este quelante, segundo informações do fabricante (Sigma-Aldrich Technical Service), apresenta carga nula entre os pHs 2,0 e 3,0, indicando que em pH neutro, quando não quelatado ao metal, o IDA esta com carga líquida negativa.

Em termos de estabilidade das ligações quelato, agentes quelantes tetradentados ou pentadentados são, geralmente, superiores aos tridentados. O agente quelante Tris carboximetil etilenodiamina (TED), por ser pentadentado e apresentar quatro anéis quelatos contendo cinco átomos cada um, apresenta boa estabilidade nas ligações quelatos quando quelatados ao níquel e ferro mostrando a potencialidade de sua utilização em IMAC na adsorção de proteínas (Porath e Olins, 1983, Lihme e Hansen, 1997). Porém, como este agente quelante disponibiliza apenas 1 sítio de coordenação do metal com a proteína, a capacidade de adsorção do complexo TED-Me(II) é bastante reduzida.

Os agentes quelantes tetradentados, como o ácido nitrilotriacético (NTA) e o ácido aspártico carboximetilado (CM-Asp) podem apresentar a vantagem de formar quelatos mais estáveis que o IDA (Yoshida *et al*, 2001, Anspach *et al*, 1996). Os agentes quelantes tetradentados ocupam quatro sítios de coordenação do metal e deixam dois sítios de coordenação disponíveis para a interação com a proteína (Wong *et al*, 1991; Hochuli *et al*, 1988) e dessa forma tendo uma capacidade adsortiva maior que o TED. O CM-Asp é utilizado para purificação de proteínas com sucesso. Chaga *et al* (1999) purificaram a proteína lactato desidrogenase (LDH) em uma única etapa utilizando agarose-CM-Asp-Co(II), obtendo uma pureza de 95%. Este quelante apresenta em sua estrutura três átomos de oxigênio e um de nitrogênio para coordenação com o metal, formando três anéis quelato, sendo dois anéis constituído de cinco átomos e o anel restante por seis átomos. O CM-Asp apresenta três grupamentos carboxila de pKs inferiores de 3,0 indicando que a pH neutro, quando não quelatado ao metal, o CM-Asp apresente carga líquida negativa.

O quelante Tris(2-aminoethyl)amina (TREN) é tetradentado e foi utilizado pela primeira vez na técnica de IMAC por Boden *et al*, 1995 para a purificação de imunoglobulina G de cabra utilizando-se o gel Novarose como matriz. Estudos realizados

por Sharma e Agarwal, 2002 mostraram que o TREN apresenta boa estabilidade quelato em pHs neutros e levemente básicos, porém a pHs baixos ($> \text{pH } 5,0$), não apresenta estabilidade. A influência do pH na capacidade do TREN em quelatar metal é muito mais pronunciada para este agente quelante do que para o IDA. Em pHs baixos a capacidade do TREN em quelatar cobre e níquel é reduzida, devido à protonação dos átomos de nitrogênio presentes em sua estrutura. O ponto de carga nula deste agente quelante está por volta de pH 10,5, indicando que em pHs abaixo deste valor o TREN está com carga líquida positiva e estando completamente protonado em pH entre 3,0 e 4,0 (Sigma-Aldrich Technical Service).

De acordo com as características dos agentes quelantes apresentados, nota-se que a escolha do agente quelante, nos processos de purificação de proteínas por IMAC, influencia fortemente na capacidade do íon metálico em adsorver proteínas. Porath, 1988 estabeleceram a afinidade e capacidade de adsorção dos complexos Me(II)-agente quelante em adsorver proteínas como sendo da seguinte ordem:



Porém, a estabilidade quelato dos complexos citados é de ordem inversa a apresentada. O quelante TREN não foi mencionado nos estudos realizados por Porath, 1988, já que este agente quelante foi pouco utilizado até então.

As condições operacionais influenciam, igualmente, na capacidade de adsorção de proteínas e seletividade. As condições de adsorção e eluição de proteínas são de grande importância nos processos envolvendo IMAC.

2.3.2 Condições de adsorção e eluição em IMAC

A adsorção de proteínas em suporte contendo os íons Cu(II), Ni(II), Zn(II), Co(II) imobilizados é feita a um pH no qual o nitrogênio do anel imidazol do resíduo histidina não está protonado, normalmente em meio neutro ou levemente básico (Porath, 1975).

Os adsorventes de IMAC podem apresentar carga líquida positiva ou negativa dependendo do agente quelante empregado, desta forma, normalmente a adição de sal

cloreto de sódio é feita para reduzir as interações eletrostáticas não específicas, para melhorar a seletividade e aumentar a estabilidade do complexo formado (Porath e Olin, 1983).

A eluição da proteína pode ser feita por protonação, adição de um agente competidor ou deslocamento do complexo metal-proteína pela adição de um agente quelante mais forte como o EDTA. A protonação é o método mais utilizado e consiste do abaixamento em pH. A presença de íons H^+ faz com que haja uma protonação dos grupos doadores de elétrons da proteína e dessa forma a interação com íon metálico é enfraquecida e a proteína é desprendida para a fase móvel. A eluição por adição de um agente competidor é feita a pH neutro, normalmente o agente adicionado é o imidazol. O deslocamento do complexo metal-proteína pela adição de um agente quelante mais forte, embora seja efetivo, não é seletivo e é, portanto, utilizado quando a proteína de interesse é a única espécie adsorvida (Winzerling *et al*, 1992).

2.3.3 Purificação de anticorpos utilizando a técnica de IMAC

A técnica de IMAC é utilizada para a purificação de anticorpos devido, principalmente, à presença, de resíduos histidina acessíveis na superfície da molécula. Hale e Beidler, 1994 descreveram uma região rica em histidina no terceiro domínio da cadeia pesada, na região (CH_3) da IgG₁ murina. A retenção da imunoglobulina pelos íons metálicos imobilizados se daria, então, pela parte Fc da cadeia pesada. Propõe-se que este domínio, rico em histidina, é mantido em diversas outras sub-classes de IgG humanas, de coelho, suínas e outras. Todorova-Balvay *et al*, 2004 propõem que a retenção da IgG se dá, principalmente, pelas histidinas localizadas nas posições 433 e 435 na parte Fc da IgG humana. Essas histidinas, separadas somente por um aminoácido, seriam as responsáveis pela retenção da IgG pelos complexos IDA-Zn(II) e IDA-Co(II), condição limitante para a retenção de proteínas por esses quelatos, em acordo com Sulkowski *et al*, 1989. É proposto, também, a presença de histidinas na estrutura primária dos fragmentos F(ab')₂, porém não próximas umas das outras, o que explicaria a retenção desses fragmentos somente pelos complexos IDA-Cu(II) e IDA-Ni(II).

A Tabela 2.4 ilustra alguns dos adsorventes utilizados na purificação de IgG. Os resultados promissores, obtidos por diversos pesquisadores, fazem de IMAC uma boa alternativa aos métodos já existentes para a purificação de IgG. A literatura consultada registra vários artigos para a purificação de IgG de variadas fontes utilizando-se, principalmente, o agente quelante IDA.

Tabela 2.4: Purificação de anticorpos por IMAC

Agente quelante	Íon metálico quelatado	Imunoglobulina purificada	Pureza (%)	Referência
IDA (ácido iminodiacético)	Ni(II)	IgG ₁ murina	90	Hale e Beidler, 1994
	Ni(II) Cu(II) Co(II) Zn(II)	IgG humana	n.d.	Vançan <i>et al</i> , 2002
	Zn(II)	IgG ₁ murina	n.d	Serpa <i>et al</i> , 2005
	Ni(II)	IgG ₁ murina	80,8	Tishchenko <i>et al</i> , 2002
	Ni(II)	IgG humana	n.d.	Porath e Olin, 1983
Asp (Ácido aspártico)	Ni(II)	IgG ₁ murina	88,5	Tishchenko <i>et al</i> , 2002
TREN (Tris(2-aminoetil)amina)	Cu(II)	IgG de cabra	>95	Boden <i>et al</i> , 1995
TED (tris carboximetil etilenodiamina)	Fe(II)	IgG humana	n.d	Lihme e Hansen, 1997
	Ni(II)	IgG humana	n.d.	Porath e Olin, 1983
NTA (ácido nitrilotriacético)	Ni(II)	Fragmentos de anticorpo	n.d.	Yoshida <i>et al</i> , 2001
	Ni(II)	IgG ₁ murina	n.d.	Anspach <i>et al</i> , 1996

n.d. – não disponível

A eficiência na purificação de IgG pela técnica de IMAC depende de vários fatores conforme apresentado neste item. Outro fator a ser considerado é a escolha da matriz a ser empregada. A maior parte dos processos de purificação de proteínas envolvendo a técnica de IMAC utiliza géis tradicionais como matriz. Os processos envolvendo géis convencionais, apesar de serem muito utilizados, possuem algumas desvantagens. Quando operada a altas vazões, a queda de pressão na coluna cromatográfica é alta e tende a aumentar durante o processo devido a efeitos combinados de consolidação do leito (causado por deformação da fase estacionária) e acúmulo de materiais coloidais na coluna. A difusão intra-partícula, o transporte do soluto para os sítios de ligação dentro dos poros da partícula, aumenta o tempo do processo, já que o transporte de macromoléculas por difusão é lento. Conseqüentemente, o volume de líquido de eluição necessário aumenta. Outra desvantagem inclui os caminhos preferenciais formados, levando a uma sub-utilização da coluna. Uma forma de superar as limitações das colunas cromatográficas de géis tradicionais é a utilização de membranas como suporte para imobilização de ligantes (Charcosset, 1998, Zou *et al*, 2001).

2.4 MEMBRANAS DE AFINIDADE

Os métodos cromatográficos utilizando-se membranas de afinidade foram introduzidos nos anos 80 e, desde então, são utilizados como uma alternativa eficiente aos géis cromatográficos tradicionais (Haupt e Bueno, 2000). O método da cromatografia em membranas de afinidade integra as operações de filtração com a cromatografia de afinidade (Brandt *et al*, 1988; Ghosh, 2001, Zou *et al*, 2001). O princípio da separação nestas membranas consiste na adsorção da biomolécula de interesse a um ligante imobilizado no interior dos poros da membrana. A solução contendo a biomolécula a separar passa através da membrana por convecção, ao contrário dos géis. Este transporte convectivo facilita o acesso da biomolécula ao sítio de fixação do ligante (Unarska *et al*, 1990). As moléculas grandes e partículas que não atravessam os poros são eliminadas na linha do retido, enquanto as moléculas pequenas, inclusive a de interesse, atravessam os poros onde o

ligante está imobilizado. A biomolécula de interesse é, então, adsorvida enquanto as moléculas não adsorvidas são eliminadas na linha do filtrado e do retido (Zeng, 1999).

A utilização de sistemas que utilizam membranas possui a vantagem de proporcionar, devido ao transporte convectivo, o tratamento de grandes volumes por unidade de tempo. Dessa forma, o sistema permite operar a altas vazões empregando-se pressões moderadas e sem o aparecimento de caminhos preferenciais, favorecendo a ampliação de escala (Charcosset *et al*, 1998; Haupt e Bueno, 2000).

Assim, como em filtração em membranas em geral, as membranas de afinidades podem ser utilizadas em várias configurações e geometrias. Normalmente, os dois tipos de formas geométricas mais usadas são membranas plana e cilíndrica, sendo que, cada uma destas formas pode ser utilizada individualmente ou em módulos de diferentes configurações. De um modo geral, se a molécula de interesse deve ser recuperada de soluções complexas como sangue, plasma ou soluções contendo outras moléculas de alta massa molecular ou material particulado, o uso da filtração em modo frontal não deve ser empregado devido a formação da camada de polarização na superfície da membrana. A alternativa a esse problema é a operação em modo tangencial e, dessa forma, a camada de polarização é diminuída. As membranas de fibras ocas, geralmente, são as mais utilizadas para esse modo de operação. O esquema da cromatografia de afinidade utilizando-se membranas de fibra oca em modo operacional tangencial é ilustrado na Figura 2.4.

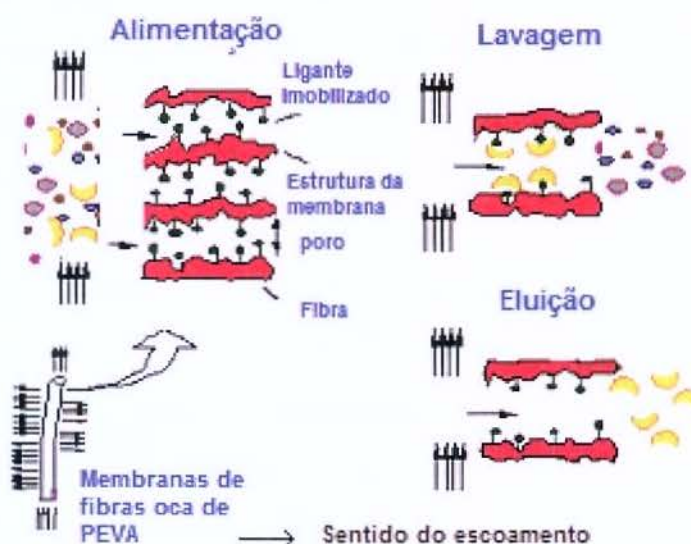


Figura 2.4: Esquema da cromatografia de afinidade utilizando-se membranas de fibra oca em modo operacional tangencial (Adaptado de Acconci, 1998).

Vários aspectos devem ser levados em conta no processo de seleção de membranas visando a sua utilização como matrizes para a imobilização de ligantes para fins de purificação de biomoléculas. As membranas devem ser hidrofílicas, devem apresentar grupamentos que possam ser facilmente ativáveis, serem estáveis em uma larga faixa de pH e na presença de sais, resistirem a solventes orgânicos e aos reagentes utilizados nas etapas de ativação e imobilização do ligante (Haupt e Bueno, 2000).

Nas últimas décadas, muitos pesquisadores estudaram os processos de purificação de biomoléculas pela cromatografia em membranas de afinidade. Diversos estudos foram realizados referente à utilização das membranas de afinidade na recuperação e purificação de IgG de diversas fontes (Tabela 2.5). Ligantes bioespecíficos (proteína A e G), assim como alguns ligantes pseudobioespecíficos, foram imobilizados em membranas com resultados satisfatórios para a purificação de imunoglobulinas.

Tabela 2.5: Purificação de imunoglobulinas G por ligantes imobilizados em membranas

Ligante	Imunoglobulina purificada	Tipo de membrana empregada	Referência
<i>Bioespecíficos</i>			
Proteína A	IgG ₁ e IgG ₂ murina monoclonal a partir de sobrenadante de cultura celular	Epoxy sartobind® (Sartorius)– Membranas planas	Langlotz e Kroner, 1992
	IgG humana	Poli(éter-uretano-urea) – Membranas planas	Bamford <i>et al</i> ,1992;
		Compósito (Sepracor Inc.) – Membranas planas	Brandt <i>et al</i> . 1988; Charcosset <i>et al</i> , 1995
		Nylon recoberto por dextrana e álcool polivinílico (PVA) - Membranas planas	Castilho <i>et al</i> , 2002, Castilho <i>et al</i> , 2000
Proteína A/G recombinante	IgG humana	Poli(caprolactama modificada) – Membranas planas	Klein <i>et al</i> , 1997
Proteína A/G	IgG humana		Dancette <i>et al</i> , 1999
Proteína A recombinante	IgG humana	Membrana de polietersulfona recoberta com quitosana – Membranas de fibras ocas	Klein <i>et al</i> , 1994
		Compósito de celulose e acrílate– Membranas planas	Hou <i>at al</i> , 1991
<i>Pseudobioespecíficos</i>			
Triptofano	IgG bovina	Polietileno recoberta com diclicidil metacrilato – Membranas de fibras ocas	Kim <i>et al</i> , 1991 (a)
Fenilalanina	IgG bovina	Polietileno recoberta com diclicidil metacrilato – Membranas de fibras ocas	Kim <i>et al</i> ,1991 (b)
Histidina	IgG humana	Álcool polietilenovinílico (PEVA) – Membranas de fibras ocas	Haupt <i>et al</i> , 1995; Bueno <i>et al</i> , 1995 (a); Bueno <i>et al</i> , 1995(b); Bueno <i>et al</i> , 1996
IDA-Cu(II)	IgG humana	Membranas de celulose	Hari <i>et al</i> , 2000
IDA- Zn(II)	IgG ₁ monoclonal a partir de sobrenadante de cultura celular	Álcool polietilenovinílico (PEVA) – Membranas de fibras ocas	Serpa <i>et al</i> , 2005
2- mercaptoetanol	IgG ₁ e IgG ₂ monoclonal a partir de sobrenadante de cultura celular	Epoxy sartobind® (Sartorius) – Membranas planas	Finger <i>et al</i> , 1995
	IgG humana	Álcool polietilenovinílico (PEVA) – Membranas de fibras ocas	Coffinier <i>et al</i> , 2002
Mercaptohetero- cíclico	IgG humana	Álcool polietilenovinílico (PEVA) – Membranas de fibras ocas	Coffinier <i>et al</i> , 2004

A técnica de cromatografia de afinidade em membranas se mostra promissora em sua utilização na purificação de anticorpos. A literatura consultada registra artigos publicados sobre purificação de anticorpos empregando-se íons metálicos imobilizados em membrana com resultados promissores (Hari *et al*, 2000, Serpa *et al*, 2005). Porém, essas pesquisas envolvem, majoritariamente, o emprego do agente quelante IDA, tornando-se necessário estudos aprofundados do emprego de outros agentes quelantes imobilizados em membranas nos processos de purificação e recuperação de anticorpos.

CAPÍTULO 3

MATERIAIS E MÉTODOS

Esta pesquisa teve caráter multidisciplinar, abrangendo a área de Engenharia Química e a área Biológica, tendo-se a colaboração na área Biológica da Profa. Dra. Mookambeswaran Vijayalakshmi da Université de Technologie de Compiègne (UTC), França. Os procedimentos referentes à imobilização de agentes quelantes às matrizes, bem como os experimentos cromatográficos utilizando o íon metálico cobre foram realizados pela doutoranda no Laboratoire d'interactions Moléculaires et de Technologie de Séparations, LIMTechS, UTC, França, durante o programa de doutorado sanduíche. Os outros procedimentos experimentais foram todos realizados no Laboratório de Interação Molecular e Bioengenharia, LIMBio, UNICAMP, sob orientação da Profa. Dra. Sônia Maria Alves Bueno.

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Reagentes

Ácido morfolinopropanosulfônico (Mops), ácido (2[N-Morpholino]ehtanesulfônico (Mes), imidazol, sulfato de níquel e sulfato de cobre foram adquiridos da Sigma (EUA). Hidroximetil aminometano (Tris), ácido etileno-diamino-tetracético sal dissódico (EDTA), acetato de sódio e cloreto de sódio foram adquiridos da Merck (Alemanha). Hidróxido de sódio e carbonato de sódio foram adquiridos da LabSynth (Brasil). Para as análises de eletroforese SDS-PAGE foram utilizados azul de Coomassie R-250 e acrilamida, adquiridos da Sigma (EUA). Azul de bromofenol, SDS (dodecil sulfato de sódio), N, N, N', N'- tetra-metilenodiamina (TEMED), dodecil sulfato de sódio (SDS) e glicerol foram adquiridos da Amersham Biosciences (EUA). Em cada eletroforese utilizou-se o kit de marcadores de alta massa molecular, adquirido da Amersham Biosciences (EUA), contendo as seguintes proteínas: miosina (212 kDa), α 2-macroglobulina (170 kDa), β -galactosidase

(116 kDa), transferrina (76 kDa) e desidrogenase glutâmica (53 kDa). Para a preparação de todas as soluções foram utilizados água ultrapura, obtida pelo equipamento Milli Q (Millipore, EUA).

Reagentes e calibradores de IgA, IgM, IgG, transferrina e albumina foram obtidos da Beckman Coulter (EUA) para realização das análises nefelométricas.

Na ativação das matrizes e imobilização dos ligantes utilizou-se boroidreto de sódio, ácido iminodiacético (IDA), Tris-2(aminoetil)amina (TREN), epícloridrina, 1,4 butanodiol diglicidil éter (bisoxirano), ácido aspártico e ácido bromoacético, adquiridos da Sigma (EUA).

Nos experimentos utilizando-se soluções de IgG humana pré-purificada foi utilizado γ -globulina da Aventis Behring (Alemanha). Todos os demais reagentes utilizados neste trabalho foram de grau analítico.

Nos experimentos utilizando-se soluções de plasma humano foi utilizado plasma do doador Mariana Borsoi Ribeiro com a seguinte especificação:

12-13 mg/mL de IgG; 3,2-3,8 mg/mL de IgA; 1,2-1,7 mg/mL de IgM; 33-39 mg/mL de albumina e 2,2-2,7 mg/mL de transferrina.

3.1.2 Matrizes

Para os experimentos cromatográficos utilizando gel de agarose foram empregadas Sepharose 6B da Amersham Biosciences (EUA). As especificações são apresentadas na Tabela 3.1:

Tabela 3.1: Especificações da Sepharose 6B

Limite de exclusão	4 – 4.000 KDa
Área superficial ⁽¹⁾	~75 m ² /g
Diâmetro da partícula	40-165 μ m

* Fonte: Amersham Biosciences (EUA), exceto ⁽¹⁾ (Guisan e Blanco, 1987): valores dados em m²/mL, 3 mL de agarose ~ 1 g de gel seco.

Nos experimentos cromatográficos utilizando membranas como suporte, foram empregadas membranas microporosas comerciais na configuração de fibras ocas de álcool polietilenovinílico (PEVA), de marca Kuraray Co (Japão). As especificações da membrana estão apresentadas na Tabela 3.2.

Tabela 3.2: Especificações da membrana de PEVA

Diâmetro médio de poro	0,05 μm
Tamanho nominal de poro	600 KDa
Diâmetro interno da fibra	200 μm
Diâmetro externo da fibra	240 μm
Área superficial ⁽¹⁾	49,5 m^2/g
Espessura da parede da fibra	20 μm

Fonte: Kuraray (Japão), exceto para ⁽¹⁾ (Petsch *et al.*, 1998).

3.1.3 Plasma humano

Amostras de sangue de indivíduo sadio (doador) foram coletadas em tubos contendo o anticoagulante heparina sódica. As amostras foram homogeneizadas imediatamente após a coleta e posteriormente centrifugadas durante 10 min a 200 x g. O sobrenadante (plasma) foi congelado a -10 °C para posterior utilização nos ensaios cromatográficos.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Quantificação e identificação de proteínas

3.2.1.1 Quantificação de proteínas totais

A quantificação de proteínas nas frações cromatográficas foi determinada pelo método de Bradford (1976) utilizando-se albumina de soro bovino, BSA (Sigma, EUA), como proteína de referência para os experimentos utilizando plasma humano e γ -globulina

(Aventis Behring, Alemanha) como proteína de referência para os experimentos utilizando IgG humana pré-purificada.

3.2.1.2 Eletroforese SDS-PAGE

As frações protéicas obtidas nas etapas de adsorção, lavagem e eluição da cromatografia foram analisadas por eletroforese SDS-PAGE no equipamento Mini Protean III (Bio-Rad, EUA), em gel de poliacrilamida na concentração de 7,5%. As amostras foram tratadas com tampões contendo SDS (sem a presença de β -mercaptoetanol). As amostras foram aquecidas a 100°C por 10 minutos e alíquotas de 10 a 15 μ L de cada amostra foram aplicadas aos géis. Os géis foram submetidos a uma voltagem de 180 V, em cuba vertical e coloridos com nitrato de prata, conforme Morrissey, 1981.

3.2.1.3 Dosagem das concentrações de IgG, IgA, IgM, transferrina e albumina

A dosagem das concentrações de IgA, IgM, IgG, transferrina e albumina presentes no plasma humano foram determinadas por nefelometria, de acordo com o manual do nefelômetro Array Protein System 360 (Beckman Coulter, EUA). O princípio do método baseia-se no espalhamento de luz obtida pelos complexos (anticorpo específico-antígeno) em suspensão na amostra a ser medida quando submetido a um feixe luminoso incidente. A variação da intensidade do espalhamento de luz medida pelo nefelômetro é convertida em unidades de concentração (mg/dL). As concentrações mínimas detectadas pelo equipamento são de 1,11 mg/dL, 0,93 mg/dL, 0,69 mg/dL, 0,62 mg/dL e 0,35 mg/dL para IgA, IgG, IgM, albumina e transferrina, respectivamente

3.2.2 Imobilização de agentes quelantes ao gel de agarose e a membranas de PEVA finamente cortadas

As membranas de álcool poli(etilenovinílico) (PEVA) são constituídas de 70% de grupamentos hidrofílicos (álcool vinílico) e 30% de grupamentos hidrofóbicos (etileno) (Sakurada *et al*, 1987). Os grupamentos hidroxilas, presente em sua estrutura, permitem a

ativação por vários reagentes, dentre eles, a epícloridrina e o bisoxirano, que possuem grupamento epoxi, pela formação de ligação éter com a matriz.

Antes da realização dos experimentos de ativação das matrizes, as membranas de PEVA foram removidas do cartucho comercial e foram finamente cortadas em tamanhos de aproximadamente 3 mm. O gel de agarose e as membranas de PEVA finamente cortadas foram lavadas com água ultra-pura e, em seguida, foram desgaseificadas para a remoção de ar presente dentro dos poros.

Ativação das matrizes com epícloridrina

A ativação do gel de agarose (20 g de gel filtrado a vácuo por 5 min) e das membranas de PEVA (16 g de fibras filtradas a vácuo por 5 min) foi realizada com epícloridrina, de acordo com o protocolo descrito por Porath e Olin, 1983 e Serpa *et al*, 2005. A matriz (membranas de PEVA ou gel de agarose) foi posta em um erlenmeyer de 250 mL e, então, em capela, foram adicionados à matriz, 50 mL de solução de NaOH 2M contendo 5 mL de epícloridrina e 0,266 g de boroidreto de sódio (NaBH_4). A suspensão (fibras e solução ou gel e solução) foi deixada sob agitação por 15 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foram gotejados, simultaneamente, uma solução de 50 mL de NaOH 2 M e 23,3 mL de epícloridrina durante um período de 2 horas. A mistura foi deixada sob agitação por mais 16 horas à temperatura ambiente. Após o término da reação, a matriz foi lavada com água ultrapura para remoção de excesso de epícloridrina até verificação de mesmo valor de pH da água ultrapura e para a água de descarte, indicando que todo o excesso de solução (solução com epícloridrina, NaOH e NaBH_4 com pH em torno de 10,0) foi removido.

Ativação da matriz com 1,4 butanodiol diglicidil éter (bisoxirano)

A ativação das membranas de PEVA ou do gel de agarose foi realizada como descrito por Bueno *et al*, 1995. A matriz (membranas de PEVA ou gel de agarose) foi posta em um erlenmeyer de 250 mL e, então, em capela, foram adicionados à matriz, 20 mL de solução de NaOH 0,6 M contendo 20 mL de 1,4 butanodiol diglicidil éter e 40 mg de boroidreto de sódio (NaBH_4). A suspensão (fibras e solução ou gel e solução) foi deixada sob agitação por 8 horas à temperatura ambiente. Após o término da reação, a matriz foi lavada com

água ultra pura para remoção de excesso de bisoxirano até verificação de mesmo valor de pH da água ultra pura e para a água de descarte, indicando que todo o excesso de solução (solução com bisoxirano, NaOH e NaBH₄ com pH em torno de 10,0) foi removido.

Imobilização de ácido iminodiacético (IDA)

A imobilização do ácido iminodiacético, IDA, foi realizada como descrito por Porath e Olin, 1983 e Serpa *et al*, 2005. Primeiramente, a lavagem da matriz foi feita com a solução de carbonato de sódio 2 M para retirar toda a água contida na matriz. Em seguida, foi preparada uma solução de 26 g de IDA adicionados a 65 mL de NaOH 2 M e a esta solução foram adicionadas pastilhas de NaOH até obter-se pH 10,0. Em paralelo, foi preparado 65 ml de solução de carbonato de sódio 2 M. As soluções de IDA e carbonato de sódio foram misturadas, mantendo-se o pH 10,0. Esta solução resultante foi adicionada a matriz e mantida sob agitação por 24 horas, à temperatura de 65°C. Finalizada a imobilização, a matriz foi lavada com água ultrapura a fim de remover o excesso de IDA não imobilizado até verificação de mesmo valor de pH da água ultrapura e a água de descarte, indicando que todo o excesso de solução (solução com IDA e carbonato de sódio, com pH em torno de 10,0) foi removido. Os adsorventes obtidos foram denominados PEVA-IDA ou Agarose-IDA.

Imobilização de tris-(2-amino-etil)amina (TREN)

A imobilização do TREN foi realizada conforme o procedimento descrito por Boden *et al.*, 1995. Preparou-se uma solução contendo 5 mL de TREN (96% m/v) em 25 mL de água ultrapura (o frasco contendo o reagente TREN foi aberto em uma capela com atmosfera de argônio, uma vez que o mesmo absorve umidade e CO₂ do ar) . Esta solução foi adicionada à matriz (membranas finamente cortadas ou gel de agarose) previamente ativada. Esta suspensão permaneceu sob agitação durante 48 horas à temperatura ambiente. Finalizada a imobilização, a matriz foi lavada com água ultrapura para remover o excesso de TREN não imobilizado até verificação de mesmo valor de pH da água ultra pura e a água de descarte, indicando que todo o excesso de solução de TREN foi removido. Os adsorventes obtidos foram denominados PEVA-TREN ou Agarose-TREN.

Imobilização do ácido aspártico carboxi-metilado (CM-Asp)

A imobilização do CM-Asp foi realizada em duas etapas, conforme o protocolo descrito por Chaga *et al.*, 1991. Primeiramente, imobilizou-se o ácido aspártico à matriz previamente ativada, e em seguida realizou-se a carboxi-metilação.

Para a imobilização do ácido aspártico, seguiu-se o mesmo protocolo utilizado para a imobilização de ligante a partir de um grupamento amino em matriz ativada contendo grupo oxirano (matrizes ativadas por epicloridrina ou bisoxirano). A matriz foi lavada com solução de carbonato de sódio 2 M para retirar toda a água contida na matriz. Em seguida, foi preparada uma solução de 8 g de ácido aspártico dissolvida em 50mL carbonato de sódio 1 M e o pH ajustado para 11,5 com pastilhas de NaOH. Esta solução foi adicionada à matriz e a suspensão resultante foi mantida sob agitação por 24 horas. Finalizada a imobilização, a matriz foi lavada com água ultrapura para remover o excesso de ácido aspártico não imobilizado até verificação de mesmo valor de pH da água ultrapura e a água de descarte, indicando que todo o excesso de solução de ácido aspártico foi removido.

A matriz contendo o ácido aspártico imobilizado foi lavada com solução $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ 1 M pH 10,5 para retirar toda a água contida na matriz, em seguida 30 mL desta solução foi misturada à matriz. Uma solução de NaOH 4 M contendo 12,6 g de ácido bromoacético foi preparada e o pH foi ajustado para 10,5 com pastilhas de NaOH. Esta solução foi adicionada à matriz e deixada sob agitação durante a noite. Finalizada a carboximetilação a matriz foi lavada com água ultrapura para remover o excesso de ácido bromoacético até verificação de mesmo valor de pH da água ultrapura e a água de descarte, indicando que todo o excesso de solução de ácido bromoacético foi removido. Os adsorventes obtidos foram denominados PEVA-CM-Asp ou Agarose- CM-Asp.

3.2.3 Determinação da quantidade de ligantes imobilizados

A determinação da quantidade de metal quelatado nas matrizes derivatizadas com os agentes quelantes foi determinada como descrito por Serpa, 2002. A coluna cromatográfica contendo o adsorvente foi alimentada com solução de sulfato de metal a 50 mM (Cu(II) ou Ni(II)) até a saturação (em solução de acetato de sódio a pH 7,0 para adsorventes com TREN imobilizado ou em água ultra pura para os demais agentes quelantes). Em seguida,

para remover o metal fracamente quelatado, os adsorventes foram lavados seqüencialmente com água ultra pura e tampão acetato 25 mM a pH 4,0 (pH 5,0 para os adsorventes contendo o quelato TREN- Ni(II)). A eluição do metal foi realizada com solução de EDTA a 100 mM a pH 7,0. As frações de eluição foram coletadas em volumes de 3 mL e analisadas por medida de absorbância a 730 e 384 nm, respectivamente, para Cu(II) e Ni(II). A concentração de metal foi determinada utilizando-se coeficiente de extinção obtido a partir da curva de calibração do metal em solução de EDTA a 100 M pH 7,0, nos respectivos comprimentos de onda.

3.2.4. Experimentos cromatográficos em matrizes contendo íons metálicos imobilizados

Cromatografias em matrizes contendo íons metálicos imobilizados quelatados a diferentes agentes quelantes foram realizadas como descrito por Serpa *et al*, 2005, para determinação do melhor adsorvente para a purificação de IgG humana. As matrizes (fibras ocas finamente cortadas ou gel de agarose) derivatizadas com os agentes quelantes IDA, TREN e CM-Asp foram introduzidas em uma coluna cromatográfica da Amersham Biosciences (EUA) (modelo C 10/20, 10 mm de diâmetro interno x 20 cm de altura) conectada a um sistema de cromatografia de baixa pressão de marca Gilson (França). A corrente de saída do sistema foi conectada a um medidor de absorbância a 280 nm e este ligado ao coletor de frações (Figura 3.1). A coluna contendo o adsorvente foi alimentada, até a saturação, com uma solução de sulfato de cobre ou níquel (em solução de acetato de sódio, pH 7,0, para as cromatografias com o agente quelante TREN ou em água ultra pura para os demais agentes quelantes). Em seguida, a coluna contendo o adsorvente foi lavada seqüencialmente com água ultra pura e com tampão (de pH mais baixo ou de maior concentração de agente competidor) que foi utilizado na etapa de eluição, com o intuito de remover o metal fracamente adsorvido na matriz.

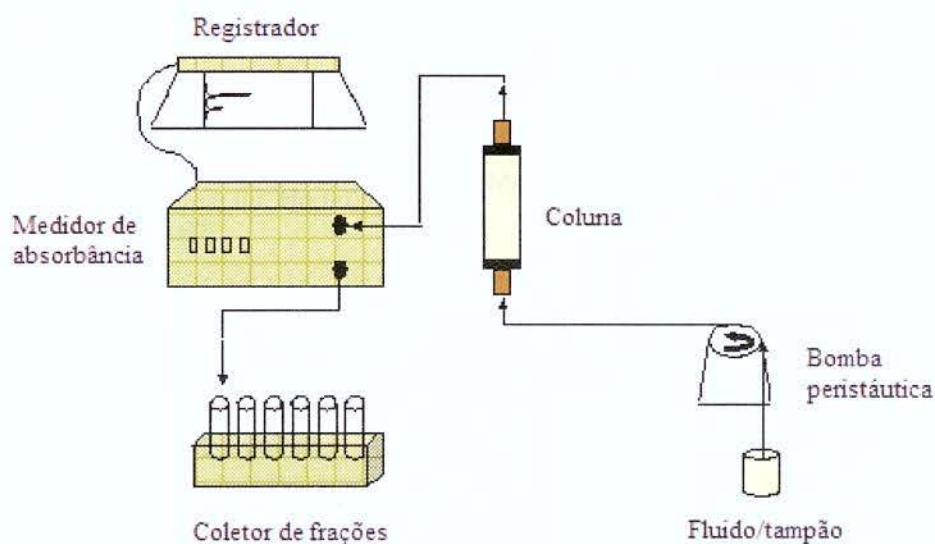


Fig. 3.1: Esquema do sistema de cromatografia para os experimentos de adsorção (adaptado de Duarte, 2001).

A coluna contendo a matriz de adsorção com o metal imobilizado foi equilibrada à temperatura ambiente a uma vazão de 0,5 mL/min com o tampão de adsorção (tampão de equilíbrio). Amostras de plasma humano diluído 1:5 em tampão de adsorção ou amostras de solução de IgG humana pura diluída em tampão de adsorção a 10 mg/mL foram alimentadas na coluna até a saturação. Finalizada a injeção, a coluna foi lavada com tampão de adsorção a fim de eliminar todas as proteínas não adsorvidas. Após a lavagem, a eluição foi realizada em etapas, de maneira gradativa, por decréscimo de pH (até pH 4,0 ou pH 5,0 para as cromatografias realizadas utilizando-se o quelato TREN-Ni(II)) ou com aumento gradativo da concentração de Tris no tampão de adsorção até a concentração de 700 mM ou imidazol até a concentração de 100 mM, conforme apresentado na Tabela 3.3.

Tabela 3.3: Soluções tamponantes empregadas nos experimentos cromatográficos

Adsorção/Lavagem	Eluição
MA (Mops 25 mM, acetato de sódio 25 mM), NaCl 1 M pH 7,0	MA 25 mM, NaCl 1 M gradiente degrau pH 6,0 a 4,0 (ou pH 5,0 para experimentos utilizando-se TREN-Ni(II))
Mops 25 mM, imidazol 2 mM, NaCl 1 M pH 7,0	Mops 25 mM, NaCl 1 M, imidazol pH 7,0 gradiente degrau da concentração de imidazol até 100 mM
Tris-HCl 25 mM pH 7,0	Tris-HCl pH 7,0 gradiente degrau da concentração de Tris até 700 mM
Tris-HCl 25 mM, NaCl 1M pH 7,0	Tris-HCl, NaCl 1 M pH 7,0 gradiente degrau da concentração de Tris até 700 mM

A coluna foi, então, regenerada com solução de EDTA a 100 mM, pH 7,0. A corrente de saída foi coletada durante todo o experimento em frações de volume de 4 mL e quantificadas pelo método de Bradford. As frações situadas nos picos de proteína foram agrupadas, sua homogeneidade foi verificada por eletroforese SDS-PAGE, analisadas por nefelometria e em seguida foi determinado o fator de purificação segundo a equação 3.1. Em algumas frações houve a necessidade de se eliminar o EDTA e os íons metálicos, utilizando-se de permeação em gel, em colunas PD-10 (Amersham Biosciences, EUA), antes da realização das eletroforeses.

$$FP = \frac{[IgG] / [PT]}{[IgG]_{injeção} / [PT]_{injeção}} \quad (3.1)$$

Sendo FT o fator de purificação, [IgG] e [PT] as concentrações de IgG e proteína total das frações agrupadas.

3.2.5 Determinação das isotermas de adsorção

Os experimentos em tanques agitados (agitação orbital) para a determinação das isotermas de adsorção foram realizados em duplicata, com soluções de IgG humana pré-

Para a determinação da área superficial (A) das membranas contidas no módulo, foi utilizada a equação 3.11:

$$A = 2\pi r_i LN \quad (3.11)$$

sendo:

r_i : raio interno das membranas (100 μm);

L : comprimento das membranas (12 cm);

N : número de fibras (150).

A área superficial foi calculada como sendo de 113 cm^2 . O volume das membranas (V) foi calculado segundo a Equação 3.12:

$$V = \pi(r_o^2 - r_i^2)LN \quad (3.12)$$

sendo:

r_o : raio externo das membranas (120 μm);

r_i : raio interno das membranas (100 μm);

L : comprimento das membranas (12 cm);

N : número de fibras (150).

O volume das membranas foi calculado como sendo 0,248 cm^3 .

3.2.7.2. Ativação e imobilização do ligante nas membranas contidas em módulos

As membranas de fibra ocas introduzidas no módulo foram primeiramente lavadas com água e em seguida com NaOH 25 mM em quatro etapas: 1) modo frontal, 2) “intraluminal” (lavagem interna), 3) espaço da concha, 4) “backflushing” (fluxo reverso do permeado), baseado no procedimento utilizado por Bueno *et al*, 1995 (a) (Figura 3.3).

$$\ln K_d = \frac{\Delta H^0}{RT} + J \quad (3.9)$$

Sendo J a constante de integração. A forma gráfica de K_d em função de $1/T$ fornece ΔH^0 pelo coeficiente angular da reta. Neste caso, ΔH^0 é independente da temperatura na faixa de temperatura estudada. O parâmetro ΔS^0 pode ser obtido a partir da relação Gibbs-Helmholtz:

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 \quad (3.10)$$

3.2.7. Determinação da curva de ruptura

Experimentos para a determinação das curvas de ruptura foram realizados em módulos contendo os ligantes selecionados imobilizados nas membranas de fibras ocas.

3.2.7.1. Construção do módulo

As membranas de fibras ocas foram retiradas do módulo comercial e 150 fibras foram introduzidas em um módulo de vidro previamente construído em escala laboratorial (comprimento de 15 cm diâmetro interno de 1 cm) com duas saídas laterais, com base no procedimento utilizado por Bueno *et al*, 1995. As extremidades das fibras ocas foram fixadas no módulo de vidro utilizando-se resina epóxi, ficando aberto somente o espaço intracapilar. A Figura 3.2 apresenta um esquema do módulo construído.

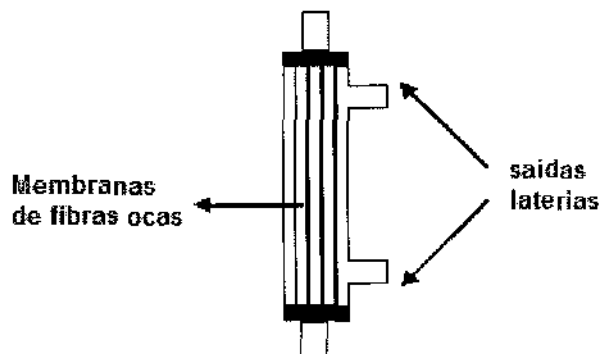


Figura 3.2: Esquema do módulo de fibras ocas de PEVA (adaptado de Serpa, 2002).

proteína-ligante imobilizado e o coeficiente de Langmüir-Freundlich (n), por regressão não-linear (método de Gauss-Marquardt), segundo a Equação 3.5 (Andrade, 1985):

$$Q^* = \frac{Q_m \cdot (C^*)^n}{K_{d(LF)} + (C^*)^n} \quad (3.5)$$

Com o modelo Multicamada de Langmüir, determinou-se os parâmetros capacidade máxima de adsorção (Q_m), a constante de dissociação ($K_d = 1/K_A$) e a constante de dissociação proteína-proteína ($K_{dd} = 1/K_{AA}$) por regressão não linear (método de Gauss-Marquardt), segundo a Equação 3.6 (Anspach *et al*, 1996):

$$Q^* = \frac{Q_m \cdot K_A}{\left(\frac{1}{C^*}\right) + K_A - 2K_{AA} + (K_{AA} - K_A)K_{AA}C^*} \quad (3.6)$$

onde K_{AA} é a constante de associação proteína-proteína.

3.2.6. Determinação dos parâmetros termodinâmicos da adsorção

As constantes de dissociação (K_d) da adsorção de IgG na matriz foram determinadas em várias temperaturas (4, 15, 25 e 37 °C) como descrito em 3.2.5, com o ajuste não-linear do modelo de Langmuir. Os parâmetros termodinâmicos foram determinados como descrito por Haupt *et al*, 1995. Da equação de van't Hoff, tem-se (Smith & Van Ness, 1987):

$$\Delta G = \Delta G^0 - R.T.\ln K_d \quad (3.7)$$

No equilíbrio $\Delta G = 0$.

$$\Delta G^0 = R.T.\ln K_d \quad (3.8)$$

Desta forma, ΔG^0 pode ser calculado a partir da constante de dissociação a uma dada temperatura. A dependência da temperatura com K_d é dada pela reação de van't Hoff na forma integrada:

purificada Aventis Behring (Alemanha) na temperatura de 25°C, com membranas finamente cortadas quelatadas com o íon metálico. Em tubos do tipo Eppendorf de capacidade de 1,5 mL, 50 mg de massa úmida (12,5 mg de massa seca) de membranas foram equilibradas com o tampão de adsorção (Tris-HCl 25 mM pH 7,0 ou MA 25 mM, NaCl 1M pH 7,0). Em seguida, foi adicionado a cada tubo, 1 mL de solução de IgG em tampão de adsorção a diferentes concentrações (0,5 a 30,0 mg/mL). Os frascos foram deixados sob agitação durante 16 horas (tempo necessário para que o equilíbrio fosse atingido), à temperatura constante. Completado este tempo, o sobrenadante foi analisado por espectrofotometria a 280 nm, utilizando-se o coeficiente de extinção de 1,4, para determinar a concentração de IgG no equilíbrio (C^*). A quantidade de proteína adsorvida por grama de adsorvente (Q^*) foi calculada usando a Equação 3.2:

$$Q^* = (C - C^*)V/M \quad (3.2)$$

Sendo C a concentração inicial de IgG adicionada no tubo, C^* a concentração de IgG após o equilíbrio ser atingido (mg/mL), V o volume de solução adicionado no tubo (mL) e M a massa de adsorvente (g). Com os valores de Q^* e C^* foi utilizado o modelo de Langmüir para determinar os parâmetros capacidade máxima de adsorção (Q_m) e a constante de dissociação (K_d) do complexo proteína-ligante imobilizado, por regressão não linear (método de Gauss-Marquardt) segundo a Equação 3.3 (Langmuir, 1918):

$$Q^* = \frac{Q_m \cdot C^*}{(K_d + C^*)} \quad (3.3)$$

A validade do modelo de Langmüir foi testada pelo gráfico de Scatchard, segundo a linearização do modelo de Langmüir:

$$\frac{Q^*}{C^*} = \frac{Q_m}{K_d} - \frac{Q^*}{K_d} \quad (3.4)$$

Para os sistemas em que o modelo de Langmuir não representou adequadamente, foi utilizado o modelo de Langmüir-Freundlich e/ou o modelo Multicamada de Langmuir.

Com o modelo de Langmüir-Freundlich determinou-se os parâmetros capacidade máxima de adsorção (Q_m), a constante de dissociação aparente (K_{dLF}) do complexo

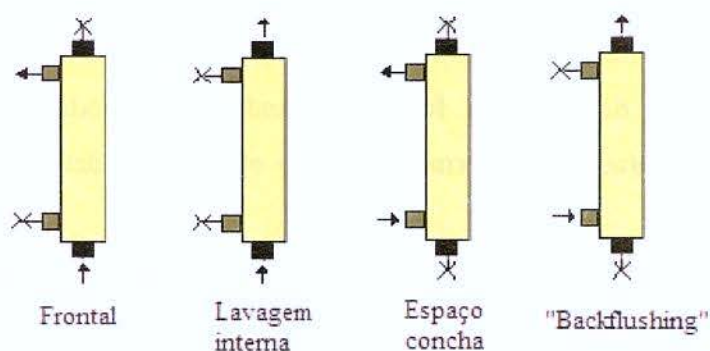


Figura 3.3: Esquema dos modos de lavagem das fibras ocas contidas no módulo de filtração (adaptado de Bueno *et al*, 1995).

A ativação das membranas e imobilização dos agentes quelantes selecionados foi feita com as soluções preparadas segundo procedimentos do item 3.2.2., ativação por epicloridrina e imobilização dos agentes quelantes IDA, TREN e CM-Asp. As soluções foram recirculadas por tempos iguais aos determinados no item 3.2.2 para géis e membranas finamente cortadas. As soluções de lavagem, de ativação ou de imobilização foram bombeadas e recirculadas através do módulo em modo tangencial, como mostra a Figura 3.4. Após a imobilização, o módulo foi lavado conforme procedimento mostrado na Figura 3.3 com água ultrapura.

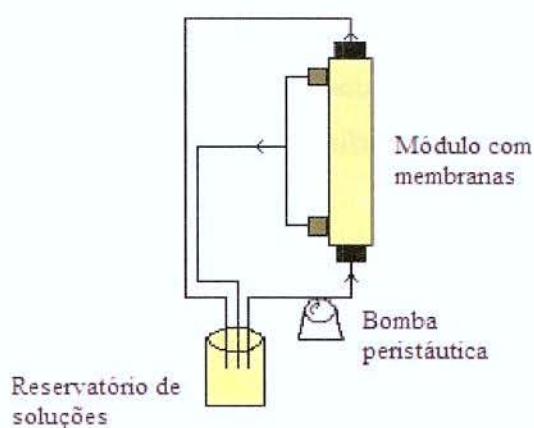


Figura 3.4: Esquema da montagem experimental para a ativação das membranas de fibra oca do módulo construído.

3.2.7.3. Experimentos de filtração

Experimentos de filtração foram realizados nos módulos contendo os ligantes imobilizados preparados anteriormente com o objetivo de determinar a curva de ruptura (“breakthrough”).

O módulo preparado foi conectado a um sistema de cromatografia de baixa pressão da marca Gilson (França). A corrente de saída foi conectada a um medidor de absorbância a 280 nm e este ligado ao coletor de frações. O módulo contendo o adsorvente foi alimentado, até a saturação, com solução de sulfato de metal a 50 mM. Em seguida, o módulo contendo o adsorvente foi lavado com água ultrapura e com tampão de eluição como esquematizado na Figura 3.3.

O módulo contendo as membranas foi equilibrado, à temperatura ambiente, com tampão de adsorção, a uma vazão de 1,0 mL/min, em modo frontal (Serpa, 2002). Amostras de plasma humano, diluído 1:5 em tampão de adsorção ou de solução de IgG humana pré-purificada a 10 mg/mL, foram alimentadas no módulo nas vazões de 1,0 e 1,4 ml/min (Q_I), em modo tangencial até a saturação (Figura 3.5a). As vazões de alimentação e filtrado (Q_F) foram fixadas a razão Q_F / Q_I em 0,5. Fixando-se a vazão do filtrado, pode-se calcular o tempo de residência (t_R) pela equação 3.13.

$$t_R = \frac{V_I}{Q_F} \quad (3.13)$$

Onde: V_I é o volume intersticial das membranas (correspondendo a 80% do volume da membrana, ou seja, 0,198 cm³, (Coffinier *et al*, 2002) e Q_F é a vazão do filtrado.

A corrente de filtrado foi monitorada a 280 nm durante toda a alimentação e as correntes de saída do filtrado e do retentado foram coletadas separadamente em frações de 1.0 mL.

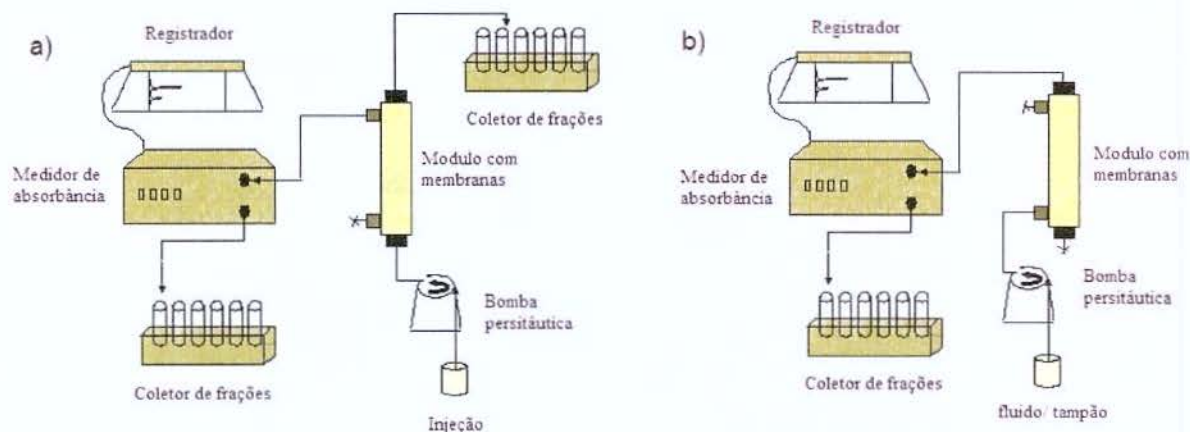


Figura 3.5: Esquema da montagem do experimento de filtração: (a) etapa de alimentação; (b) etapa de eluição e regeneração (adaptado de Aquino, 2004)

Finalizada a injeção, o módulo foi lavado conforme mostrado na Figura 3.3 com tampão de adsorção a fim de eliminar todas as proteínas não-adsorvidas. Após a lavagem, a eluição foi realizada em modo 'backflushing', em etapas, de maneira gradativa, por decréscimo de pH ou aumento da concentração de Tris, conforme o experimento (Figura 3.5b). O módulo foi regenerado com solução de EDTA 100 mM, pH 7,0. Durante as etapas de eluição e regeneração, a corrente de saída foi coletada em frações de volume de 4 mL. As frações foram quantificadas pelo método de Bradford para determinação da concentração de proteínas total e por nefelometria para determinação das concentrações de IgA, IgG, IgM, albumina e transferrina. As amostras correspondentes à etapa de alimentação e aos picos obtidos durante a etapa de eluição foram analisadas por eletroforese SDS-PAGE.

CAPÍTULO 4

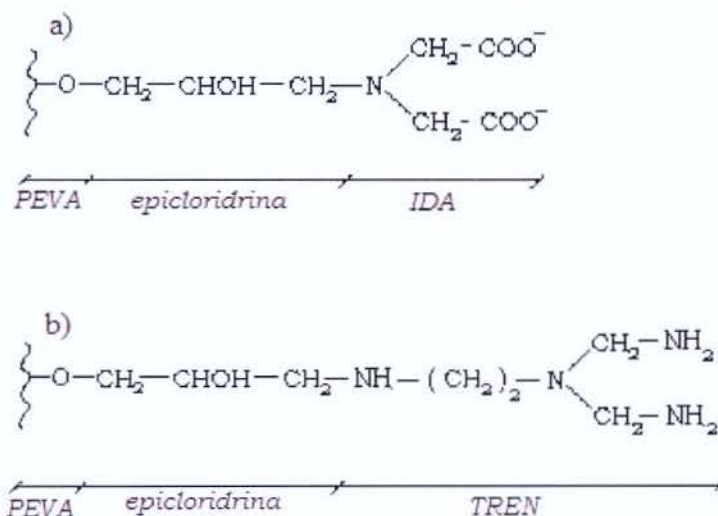
RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. PURIFICAÇÃO DE IgG HUMANA POR AFINIDADE A QUELATOS METÁLICOS (IMAC)

4.1.1. Avaliação da eficiência da imobilização dos agentes quelantes IDA, TREN e CM-ASP em membranas de PEVA finamente cortadas

4.1.1.1. Seleção do método de ativação das membranas

Os agentes quelantes IDA, TREN e CM-Asp foram imobilizados a matriz via ligação covalente entre o grupamento epóxido introduzido às membranas e o grupamento amina presente nas estruturas dos quelantes. As estruturas propostas para os agentes quelantes imobilizados em membranas de PEVA ativadas por epicloridrina e bisoxirano estão apresentadas na Figura 4.1 (a-e).



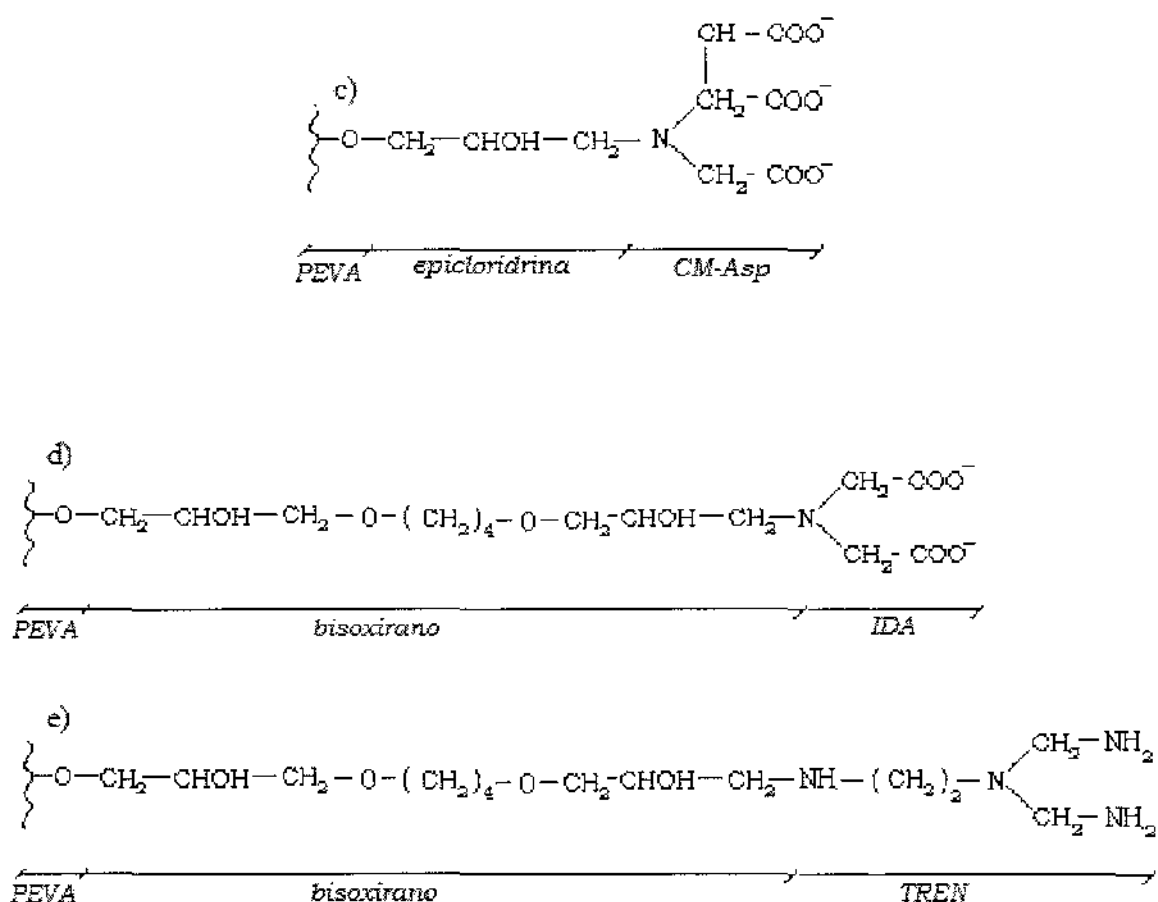


Figura 4.1: Estrutura proposta das membranas derivatizadas com os agentes quelantes a) PEVA-epicloridrina-IDA em pH neutro b) PEVA-epicloridrina-TREN em pH básico c) PEVA-epicloridrina-CM-Asp em pH neutro d) PEVA-bisoxirano-IDA em pH neutro e e) PEVA-bisoxirano-TREN em pH básico (adaptado de Gaberc-Porekar e Menart, 2001 e Sharma e Agarwal, 2001).

A seleção do método de ativação das membranas deu-se a partir da determinação da densidade de íon metálico cobre quelatado e capacidade de adsorção de IgG humana pré-purificada. A densidade de metal cobre nas membranas derivatizadas foi medida por espectrofotometria UV/VIS, como descrito em materiais e métodos, item 3.2.3. A capacidade de adsorção de IgG foi determinada pela injeção de 30-34 mg de IgG humana diluída em 3 mL de tampão MA 25 mM contendo 1 M de NaCl a pH 7.0. A eluição foi

realizada por abaixamento de pH e a regeneração com solução de EDTA 100 mM pH 7,0 (Tabela 4.1).

Tabela 4.1: Densidade de metal (Cu(II)) e capacidade de adsorção de IgG dos adsorventes estudados (membranas finamente cortadas)

Adsorvente	Ativação	Densidade de Cu(II) ($\mu\text{mol/g seca}$) ¹	Adsorção de IgG (mg/g seca) ¹
PEVA-IDA-Cu(II)	epicloridrina	50,5	16,4
PEVA-IDA-Cu(II)	bisoxirano	35,8	10,0
PEVA-TREN-Cu(II)	epicloridrina	33,3	4,8
PEVA-TREN-Cu(II)	bisoxirano	1,8	1,6
PEVA-CM-Asp-Cu(II)	epicloridrina	40,5	11,9

¹ 4 mL de membrana = 1 g de membrana seca.

A partir dos resultados apresentados na Tabela 4.1, verifica-se que a densidade de metal cobre e, conseqüentemente, a capacidade de adsorção de IgG, mostrou-se maior para os adsorventes previamente ativados por epicloridrina. O agente quelante CM-Asp foi imobilizado à membrana de PEVA ativada somente por epicloridrina, tendo em vista que, os agentes quelantes IDA e TREN demonstraram maior eficácia para imobilização em membranas ativadas por este agente de ativação. Para o agente quelante TREN, a densidade de ligantes, assim como a capacidade de adsorção de IgG foi ainda menor para as membranas ativadas com bisoxirano. Devido à natureza dos agentes de ativação empregados (bifuncionais) há possibilidade de ocorrência de reações paralelas, tais como hidrólise dos grupos epóxido ou reações cruzadas (“cross-linking”), provocado por reações entre os grupos hidroxilas remanescentes (Scoble e Scopes, 1996; Aquino, 2004). A ocorrência de reações cruzadas talvez seja maior nas membranas ativadas por bisoxirano, uma vez que este reagente apresenta uma cadeia carbônica maior, tendo como resultado menor quantidade de agentes quelantes imobilizados e, conseqüentemente, menor densidade de metal e capacidade para adsorção de IgG. Além disso, o bisoxirano possui suas duas extremidades formadas por grupos epóxidos, enquanto a epicloridrina possui em uma de suas extremidades um cloro e na outra um grupo epóxido. Talvez o cloro seja mais reativo que o grupo epóxido, fazendo com que a ativação por epicloridrina seja mais eficiente.

Em acordo com os resultados apresentados, foram selecionadas, para dar continuidade aos experimentos, as membranas de PEVA previamente ativada por epícloridrina.

4.1.1.2. Eficácia de imobilização dos íons metálicos cobre e níquel em fibras ocas de PEVA e gel de agarose ativados por epícloridrina

A eficácia da imobilização dos agentes quelantes IDA, TREN e CM-Asp a membranas de PEVA, ativadas previamente por epícloridrina, foi comparada a adsorventes preparados utilizando-se gel de agarose e outras matrizes encontradas na literatura, através da determinação da densidade de metal quelatado (Tabela 4.2).

Tabela 4.2: Densidade dos íons metálicos cobre e níquel imobilizados em matrizes derivatizadas com agentes quelantes IDA, TREN e CM-Asp.

Matriz	Agente quelante	Método de ativação	Densidade de ligantes $\mu\text{mol/g}$ seca ¹		Método de quantificação do metal	Referência
			Cu(II)	Ni(II)		
Agarose	IDA	Epíclori - drina	169,2	114,1	Espectrofotometria UV-VIS	*
Agarose	TREN	Epíclori - drina	66,2	71,5	Espectrofotometria UV-VIS	*
Agarose	CM-Asp	Epíclori - drina	115,1	110,6	Espectrofotometria UV-VIS	*
Membranas PEVA	IDA	Epíclori - drina	50,2	78,2	Espectrofotometria UV-VIS	*
Membranas PEVA	TREN	Epíclori - drina	33,3	25,6	Espectrofotometria UV-VIS	*
Membranas PEVA	CM-Asp	Epíclori - drina	40,5	70,8	Espectrofotometria UV-VIS	*
Membranas Celulose	IDA	Epíclori - drina	164,4	-	Espectrometria de absorção atômica	Wu <i>et al</i> , 2003

Continuação da Tabela 4.2

Matriz	Agente quelante	Método de ativação	Densidade de ligantes $\mu\text{mol/g}$ seca ¹		Método de quantificação do metal	Referência
			Cu(II)	Ni(II)		
Chelating Superose (i)	IDA	Não informado	45,0	-	espectrometria de absorção atômica	Belew e Porath, 1990
Chelating Superose (ii)	IDA	Não informado	90,0	-	espectrometria de absorção atômica	Belew e Porath, 1990
Chelating Superose (iii)	IDA	Não informado	126,0	-	espectrometria de absorção atômica	Belew e Porath, 1990
Chelating Sepharose Fast Flow	IDA	Não informado	93,0	-	Espectrofotometria UV-VIS	Belew <i>et al.</i> , 1987
Sepharose 6B	IDA	Bisoxirano	137,1	110,4	espectrometria de absorção atômica	Sharma e Agarwal, 2002
Sepharose 6B	TREN	Bisoxirano	98,7	79,8	espectrometria de absorção atômica	Sharma e Agarwal, 2002
Sepharose 6B	IDA	Não informado	352,0	-	espectrometria de absorção atômica	Mantovaara <i>et al.</i> , 1991
Sepharose 6B	CM-Asp	Não informado	62,0	-	espectrometria de absorção atômica	Mantovaara <i>et al.</i> , 1991
Novarose SE1000/40	TREN	Não informado	77,0 ²	-	espectrometria de absorção atômica	Boden <i>et al.</i> , 1995

* experimentos realizados neste trabalho; ¹ 3 mL de agarose = 1 g de gel seco e 4 mL de membrana = 1 g de membrana seca; ² Valores dados em $\mu\text{mol/ mL}$ de gel. (i), (ii) e (iii) indicam diferentes géis de Chelating Superose (Amersham Biosciences).

Verifica-se que os valores de densidade de metal em PEVA, apesar de serem inferiores aos apresentados para as matrizes de agarose preparadas neste trabalho, são próximos aos encontrados por outros autores na literatura. Tal observação comprovou a eficácia da imobilização dos agentes quelantes IDA, TREN e CM-Asp às membranas de PEVA.

A variação encontrada nos valores de densidade de íons metálicos imobilizados nos diferentes adsorventes ocorreu, provavelmente, devido ao método utilizado na quantificação do metal (espectrofotometria ou espectroscopia de absorção atômica), ao tipo de matriz (diferenças na sua estrutura física e química, como tamanho dos poros e material) e ao tipo de agente quelante e ao método de ativação empregado. Em relação às matrizes utilizadas neste trabalho, a maior densidade de metal encontrada para os agentes quelantes imobilizados em agarose em relação às membranas de PEVA se deve, provavelmente, à maior eficácia na ativação da matriz. O gel de agarose apresenta em sua estrutura maior número de grupamentos -OH do que as membranas de PEVA, possibilitando, desta forma, maior eficácia na ativação, (a ativação das matrizes ocorre pelos grupamentos -OH). Além disso, a área superficial da agarose é maior que a das membranas de PEVA (~75,0 e 49,5 m²/g para agarose e PEVA, respectivamente, Guisan e Blanco, 1987 e Petsch *et al*, 1998), apresentando, desta forma, maior número de grupamentos a serem ativados. Conseqüentemente, é maior a quantidade de agentes quelantes imobilizados aos géis de agarose e é maior a densidade de íons metálicos imobilizados.

Os resultados mostram que o agente quelante TREN, imobilizado tanto em membrana de PEVA quanto em gel de agarose, apresentam valores de densidade de metal para ambos, níquel e cobre, inferiores aos apresentados pelos agentes quelante IDA e CM-Asp. Isso se deve a estrutura dos agentes quelantes. Os agentes quelantes IDA e CM-Asp possuem oxigênios em sua estrutura para ligação de coordenação com o metal, enquanto o TREN possui quatro nitrogênios e nenhum oxigênio. A protonação desses nitrogênios a baixos pHs, deixam-nos menos disponíveis para as ligações de coordenação. Sharma e Agarwal, 2002, demonstraram que a influência do pH nas ligações de coordenação entre agente quelante e metal é mais pronunciada para o TREN do que para o IDA (quando imobilizados em agarose). Adicionalmente, estes estudos demonstraram menor densidade de metal para o TREN que para o IDA, em acordo com os valores encontrados neste trabalho. O agente quelante CM-Asp apresentou densidade de metal níquel similar à apresentada pelo IDA, porém densidade de metal cobre inferior.

4.1.2. Capacidade dinâmica de adsorção de IgG

A fim de avaliar a eficácia dos adsorventes preparados em adsorver IgG, experimentos de adsorção com IgG humana foram realizados e comparados àqueles realizados com gel de agarose. Foram injetadas nas matrizes IgG humana pré-purificada a 10 mg/mL em tampão MA 25 mM contendo 1 M de NaCl a pH 7,0 até a saturação da coluna. Nesta etapa, foi testado o íon metálico cobre imobilizado, visto que este íon metálico, segundo Sulkowski *et al* 1989, possui maior capacidade de adsorção de proteínas. A Tabela 4.3 apresenta os resultados da capacidade dinâmica de adsorção de cada adsorvente testado.

Tabela 4.3: Adsorção de IgG em matrizes AQ-Cu(II)

Adsorvente	Quantidade de IgG adsorvida (mg/g seca)
Agarose-TREN-Cu(II) ¹	165,0
Agarose-IDA-Cu(II) ¹	285,0
Agarose-CM-Asp-Cu(II) ¹	194,7
PEVA-TREN-Cu(II) ²	9,2
PEVA-IDA-Cu(II) ²	73,3
PEVA-CM-Asp-Cu(II) ²	60,8

¹ 3 mL de agarose = 1 g de gel seco; ² 4 mL de membrana = 1g seca de membrana

O complexo IDA-Cu(II) proporcionou a maior capacidade de adsorção de IgG seguido de CM-Asp-Cu(II) e TREN-Cu(II). Esses valores apresentados para capacidade dinâmica são coerentes, dado que o quelante tridentado IDA disponibiliza três sítios de coordenação do metal para interação com a proteína, enquanto que os agentes quelantes tetradentados TREN e o CM-Asp, disponibilizam apenas dois sítios de coordenação, minimizando, desta forma, a interação com o metal e conseqüentemente a capacidade do adsorvente em adsorver proteínas. Além disso, a menor capacidade de adsorção de IgG ao CM-Asp-Cu(II) em relação ao IDA-Cu(II), pode estar associada ao desprendimento de metal da coluna durante a cromatografia (detectado na etapa de lavagem), fato este não detectado para os adsorventes contendo IDA e TREN imobilizados.

Segundo os resultados apresentados, os adsorventes preparados utilizando-se o gel de agarose como matriz, apresentaram maior capacidade de adsorção de IgG para todos os agentes quelantes estudados. Os complexos IDA-Cu(II) e CM-Asp-Cu(II), ambos imobilizados em gel de agarose, apresentaram valores de capacidades dinâmicas de adsorção de IgG três a quatro vezes maiores que os valores apresentados para esses complexos imobilizados em membranas de PEVA. Para o complexo TREN-Cu(II) imobilizado em gel de agarose, a capacidade dinâmica de adsorção de IgG é ainda maior (até dezoito vezes) que a encontrada para esse quelante imobilizado em membranas de PEVA. Conclui-se, de acordo com os valores apresentados na Tabela 4.3, que a capacidade de adsorção de IgG aumenta com o aumento da densidade do íon metálico cobre imobilizado na matriz, já que os adsorventes preparados a partir de gel de agarose apresentam maior densidade de ligantes. Outro fator importante está no maior tamanho do poro apresentado pelos géis (limite de exclusão de 4 a 4.000 kDa, Amersham Bioscience, EUA) que pelas membranas de PEVA (limite de exclusão de 600 kDa, Kuraray, Japão). Como esses experimentos foram realizados utilizando-se membranas finamente cortadas, o transporte das moléculas até o interior dos poros é regido pela difusão e não pela convecção. Desta forma, o maior tamanho dos poros oferecido pelos géis, favorece a transferência de massa devido ao transporte difusivo de moléculas grandes, como a IgG, ao sítio de adsorção.

Apesar dos géis de agarose convencionais apresentarem alta capacidade de adsorção de IgG, estes apresentam a desvantagem do longo tempo de processamento. Quando as colunas cromatográficas são operadas a altas vazões, a queda de pressão é alta e tende a aumentar durante o processo devido a efeitos combinados de consolidação do leito (causado por deformação da fase estacionária) e acúmulo de materiais coloidais na coluna. Outro fator limitante é que o aumento da densidade de íons metálicos imobilizados e, conseqüentemente, o aumento de proteínas adsorvidas nos ligantes imobilizados a géis de agarose, pode ocasionar na menor seletividade na adsorção da proteína alvo. Serpa *et al*, 2005 demonstraram perda de seletividade na purificação de IgG₁ monoclonal a partir de sobrenadante de cultura celular em agarose-IDA-Zn(II) quando comparada a PEVA-IDA-Zn(II).

4.1.3. Influência do sistema tamponante, do agente quelante e do íon metálico na retenção de IgG humana pré-purificada

Experimentos cromatográficos foram realizados utilizando-se os adsorventes PEVA-TREN-Me(II), PEVA-IDA-Me(II) e PEVA-CM-Asp-Me(II) em presença do tampão MA 25 mM, NaCl 1 M a pH 7,0; Mops 25 mM, imidazol 2 mM contendo NaCl 1 M e Tris-HCl 25 mM pH 7,0. Utilizou-se os íons metálicos cobre e níquel imobilizados. A eluição foi realizada por gradiente de grau de decréscimo de pH (no caso do tampão MA) e por acréscimo de agente competitivo (imidazol, forte competidor e Tris, fraco competidor). Os resultados da quantidade de IgG eluída em cada etapa são ilustrados nas Figuras 4.2, 4.3 e 4.4.

Para todos os tampões e agentes quelantes estudados (IDA, TREN e CM-Asp), nota-se maior força de retenção da IgG aos adsorventes com o íon metálico cobre imobilizado ($\text{Cu(II)} > \text{Ni(II)}$). Este resultado está de acordo com a regra estabelecida por Sulkowski, 1989. Observa-se, também a seguinte ordem para os agentes quelantes estudados em relação às suas capacidades de adsorção de IgG humana (quando a alimentação encontra-se na presença dos tampões MA e Mops contendo imidazol contendo NaCl): IDA > CM-Asp > TREN, em acordo com Porath, 1988 (IDA > CM-Asp). Esses resultados se devem ao maior número de sítios disponíveis para coordenação do metal para interação com a proteína disponibilizado quando o metal está quelatado ao IDA. Normalmente, quanto mais polidentado for o agente quelante mais fraca a interação do metal com a proteína e, conseqüentemente, menor a capacidade de adsorção. Comparando-se os dois agentes quelantes tetradentados estudados, TREN e CM-Asp, nota-se que o complexo TREN-Me(II) promoveu menores quantidades de IgG adsorvida que a apresentada por CM-Asp-Me(II) em presença de todos os tampões testados.

Quando o íon metálico cobre foi utilizado, o tampão MA proporcionou a maior quantidade de IgG adsorvida, seguido do tampão Tris-HCl. Os resultados apresentados mostraram que a maior força de retenção de IgG se deu na utilização do complexo IDA-Cu(II) em presença do tampão MA (Figura 4.2.a), onde a maior parte da IgG só é eluída em presença de EDTA. Comportamento semelhante foi observado para o complexo CM-Asp-

Cu(II) em presença deste tampão. Porém, quando o íon metálico níquel foi utilizado, o tampão que proporcionou maiores quantidades de IgG adsorvida foi o tampão Tris-HCl.

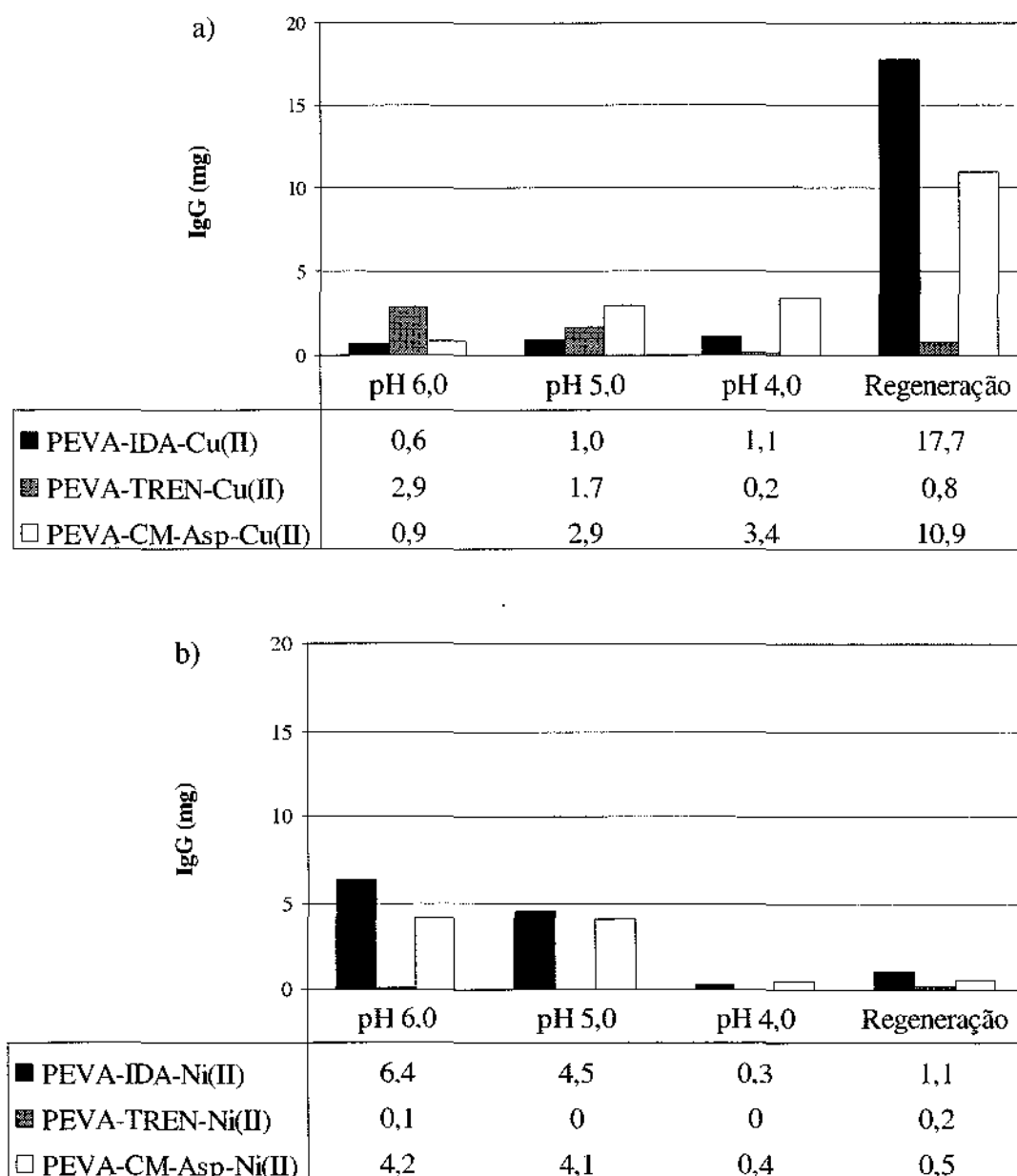


Figura 4.2: Perfil da eluição de IgG humana adsorvida em presença do tampão de adsorção MA 25 mM, NaCl 1 M pH 7,0. Volume do leito: 5 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Injeção de 30 mg de IgG. Eluição gradiente degrau pH 6,0, pH 5,0 e pH 4,0; Regeneração: solução de EDTA 100 mM pH 7,0. a) íon metálico cobre, b) íon metálico níquel.

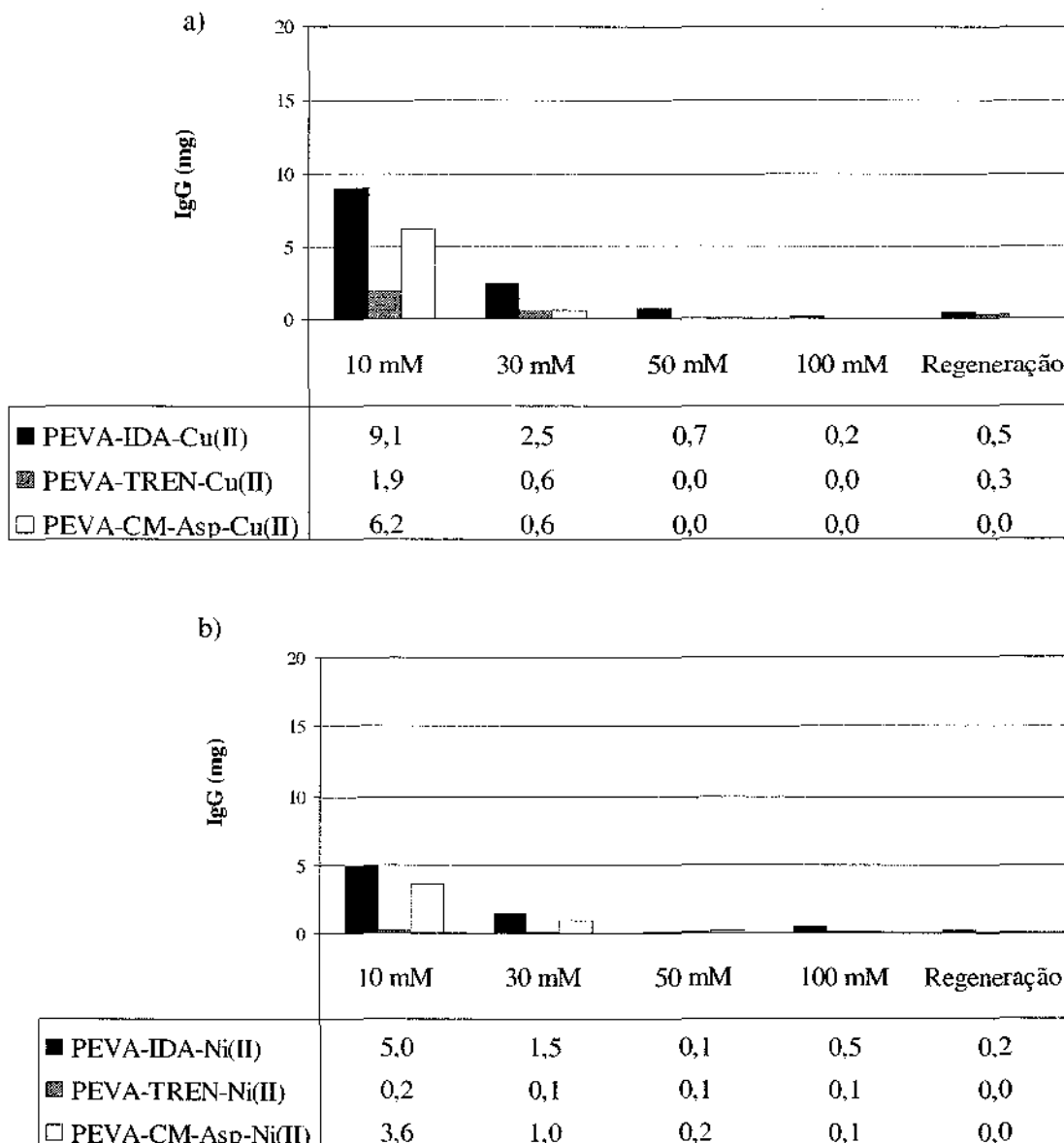


Figura 4.3: Perfil da eluição de IgG humana adsorvida em presença do tampão Mops 25 mM, NaCl 1 M e imidazol 2 mM pH 7,0. Volume do leito: 5 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Injeção de 30 mg de IgG. Eluição degrau de acréscimo da concentração de imidazol de 10, 30, 50 e 100 mM; Regeneração: solução de EDTA 100 mM pH 7,0. a) íon metálico cobre, b) íon metálico níquel.

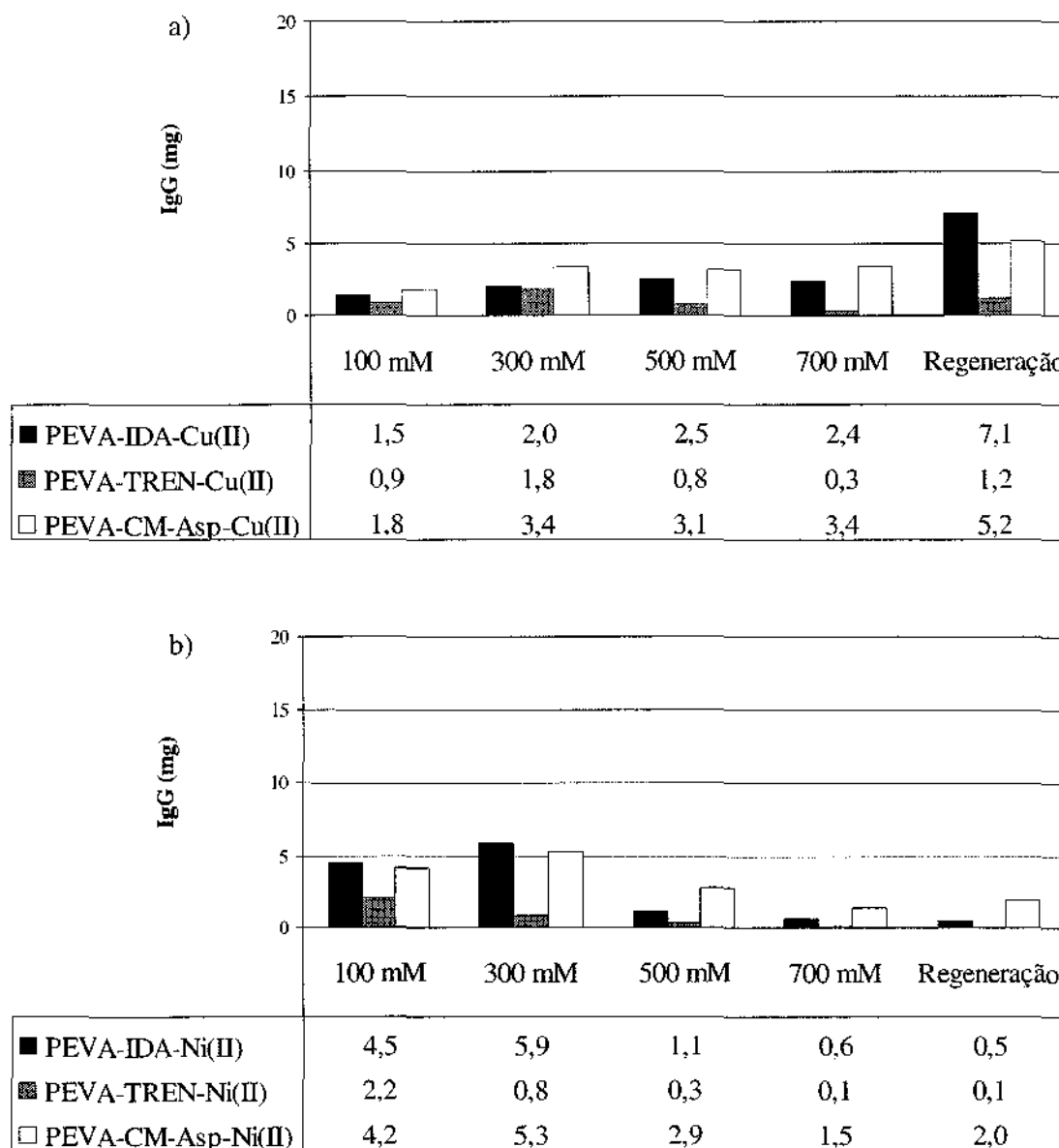


Figura 4.4: Perfil da eluição de IgG humana adsorvida em presença do tampão Tris 25 mM pH 7,0. Volume do leito: 5 mL. Injeção de 30 mg de IgG. Vazão: 5 mL/min. Eluição por acréscimo da concentração de Tris de 100, 300, 500 e 700 mM; Regeneração: solução de EDTA 100 mM pH 7,0. a) íon metálico cobre; b) íon metálico níquel.

Nota-se, dentre todos os sistemas tamponantes testados, que o tampão Mops, imidazol (Figura 4.3), possibilitou a adsorção de menores quantidades de IgG, tanto da utilização do íon metálico níquel quando do cobre para todos os agentes quelantes testados. Observa-se ainda, que a utilização do acréscimo da concentração de imidazol ao tampão de

adsorção nas etapas de eluição, ainda que em baixa concentração, foi suficiente para eluir a maior parte das proteínas logo nas primeiras frações (10 e 30 mM de imidazol). Isto se deve ao fato do imidazol ser um forte competidor pelo sítio de adsorção da proteína.

Em relação ao tampão Tris-HCl, no entanto, diferentemente dos outros tampões e da ordem estabelecida por Porath, 1988, a capacidade de adsorção de IgG obtida em presença de Tris-HCl foi, segundo o agente quelante utilizado: CM-Asp > IDA > TREN.

O tampão Tris-HCl, como se encontra em ausência de NaCl, possibilita, além da formação de ligações de coordenação, a ocorrência de interações eletrostáticas entre proteína e metal imobilizado. Segundo especificações do fornecedor (Clon-Tech), o agente quelante CM-Asp se encontra com carga nula abaixo de pH 4,0, indicando que a pH 7,0, esse quelante se encontra com carga líquida negativa. O CM-Asp possui três grupamentos carboxilas com pKs abaixo de 4,0, e mesmo quando complexados ao Me(II), a carga do complexo permanece negativa (Gaberc-Porekar e Menart, 2001) enquanto a maior parte das IgGs (ponto isoelétrico (pI) entre 6,3 e 9,0, Vlug e Remortel, 1989) em pH 7,0 estão com carga líquida positiva. Desta forma, o tampão Tris-HCl a pH 7,0, em ausência de NaCl, favorece as interações eletrostáticas entre a proteína e PEVA-CM-Asp-Me(II), aumentando a capacidade de adsorção de IgG. Porém, quanto ao agente quelante TREN (ponto de carga nula em pH 10,5, segundo especificação do fornecedor, Sigma-Aldrich), em pH 7,0, encontra-se com carga líquida positiva, repelindo eletrostaticamente as proteínas de carga positiva e atraindo possivelmente as IgGs de pIs inferiores a 7,0, que se encontram com carga negativa.

4.1.4. Influência do sistema tamponante e do agente quelante na purificação de IgG a partir do plasma humano

A fim de selecionar o melhor sistema tamponante e adsorvente para purificação de IgG a partir de solução de plasma humano, experimentos cromatográficos foram realizados utilizando-se os adsorventes PEVA-TREN-Me(II), PEVA-IDA-Me(II) e PEVA-CM-Asp-Me(II) em presença do tampão MA 25 mM, NaCl 1 M a pH 7,0; Mops 25 mM, imidazol 2 mM contendo NaCl 1 M, Tris-HCl 25 mM pH 7,0 e Tris-HCl 25 mM contendo NaCl 1 M pH 7,0. Foi injetado à coluna plasma humano diluído 1:5 em tampão de adsorção (8,5 mL)

em quantidades entre 80 e 120 mg de proteínas totais, 5,5 e 6,0 mg de IgA, 18 e 20 mg de IgG, 1,5 e 2,5 mg de IgM, 50 e 60 mg de albumina, 3,0 e 4,5 mg de transferrina. A eluição foi realizada por gradiente de grau de decréscimo de pH (no caso do tampão MA) e por acréscimo de agente competitivo (imidazol e Tris).

Testes preliminares utilizando-se PEVA-AQ-Cu(II) em presença do tampão MA (Anexos A e B) demonstraram alta capacidade de adsorção para proteína total (de duas a quatro vezes maior do que aquela apresentada quando se utilizou níquel imobilizado). No entanto, a maior capacidade de adsorção foi associada à menor seletividade na purificação de IgG. Segundo as eletroforeses SDS-PAGE apresentadas no anexo A, nota-se a adsorção de albumina em todas as cromatografias realizadas com cobre quelatado. Para os agentes quelantes IDA e CMA-Asp, o cobre promoveu forte retenção de proteínas, uma vez que grande parte destas foi eluída somente em presença de solução de EDTA. Como a presença de um único resíduo de histidina acessível na superfície da proteína é suficiente para a adsorção em íons cobre imobilizados, este metal tem a capacidade de adsorver grandes quantidades de proteínas diversas (Sulkowski, 1989). Estes resultados corroboram aqueles apresentados na seção 4.1.3 para a adsorção de IgG pré-purificada. Conclui-se, para este sistema tamponante, que a força de retenção e a capacidade de adsorção segue a ordem $\text{Cu(II)} > \text{Ni(II)}$, para os íons metálicos. Devido à maior seletividade apresentada pelo íon níquel, este foi selecionado para dar continuidade aos experimentos.

A Tabela 4.4 apresenta o resumo do efeito do sistema tamponante na adsorção de IgG em PEVA-AQ-Ni(II). Os anexos A a H apresentam os cromatogramas bem como os balanços de massa para proteína total, IgG e albumina. As quantidades de IgA e IgM foram, igualmente medidas por nefelometria, porém em nenhum dos experimentos realizados houve a adsorção dessas proteínas.

Tabela 4.4: Proteína total e IgG adsorvida nas cromatografias realizadas com diferentes sistemas tamponantes.

Tampão de adsorção		PEVA-IDA-Ni(II) ⁴		PEVA-TREN-Ni(II) ⁴		PEVA-CM-Asp-Ni(II) ⁴	
		PT ¹	IgG ²	PT ¹	IgG ²	PT ¹	IgG ²
MA 25 mM, NaCl 1 M pH 7,0	(mg)	9,8	7,1	1,4	0,4	6,7	6,1
	(%)	8,7	36,2	1,3	2,2	7,6	31,1
Mops 25 mM, imidazol 2 mM, NaCl 1 M pH 7,0	(mg)	6,4	5,5	0,8	bt ³	4,5	2,4
	(%)	6,5	28,7	0,8	0	4,5	12,6
Tris-HCl 25 mM pH 7,0	(mg)	10,9	9,0	29,0	2,4	11,2	9,6
	(%)	9,9	49,5	26,9	14,6	12,3	54,9
Tris-HCl 25 mM, NaCl 1 M pH 7,0	(mg)	9,4	6,1	1,5	0,2	7,3	4,6
	(%)	7,9	31,4	1,5	1,0	8,8	24,2

¹ PT- proteína total, dosagem pelo método de Bradford, 1975. ² IgG, imunoglobulina G, dosagem por nefelometria, ³ bt, abaixo do limite detectável, ⁴ volume do leito: 5 mL ou 1.25 g de membrana seca.

O tampão MA proporcionou baixa capacidade de adsorção para IgG (0,4 mg de IgG adsorvida) para PEVA-TREN-Ni(II) quando comparado a PEVA-IDA-Ni(II) e PEVA-CM-Asp-Ni(II) (7,1 e 6,1 mg de IgG adsorvida, respectivamente). No entanto PEVA-TREN-Ni(II) demonstrou maior seletividade, segundo eletroforese SDS-PAGE (Anexo A). Para os adsorventes PEVA-IDA-Ni(II) e PEVA-CM-Asp-Ni(II), ainda que a presença de albumina pela análise nefelométrica esteja abaixo do limite detectável, a eletroforese SDS-PAGE das frações de eluição acusaram contaminação por albumina e outras proteínas do plasma humano (Anexo A).

O tampão que proporcionou a menor capacidade de adsorção tanto de proteínas totais como de IgG foi o Mops com 2 mM imidazol. O imidazol, forte competidor, compete com a proteína pelos sítios de adsorção, minimizando a capacidade de adsorção. Além de proporcionar as menores quantidades de IgG adsorvida, este tampão não proporcionou boa seletividade para IgG (Anexo C). Para ambos os complexos IDA-Ni(II) e CM-Asp-Ni(II), observou-se a dessorção da maior parte da IgG e de outras proteínas com concentrações baixas de imidazol (10 mM e 30 mM) (Anexo C e D), fato também observado nos experimentos efetuados com IgG pré-purificada (seção 4.1.3). A capacidade de adsorção do

complexo TREN-Ni(II) em presença deste tampão foi baixa, não sendo possível a detecção pela análise nefelométrica de nenhuma proteína medida (albumina, IgG, IgA, IgM e transferrina), embora a eletroforese SDS-PAGE acuse a presença de IgG e albumina (Anexo C) nas frações de regeneração.

O tampão Tris-HCl, na ausência de sal, favoreceu maior adsorção de IgG na membrana PEVA-TREN-Ni(II) (2,4 mg), porém acompanhada de grande quantidade de albumina (19 mg), demonstrando baixa seletividade para a purificação de IgG (Anexo E). A estrutura do complexo TREN-Ni(II) apresenta carga geral positiva (Sharma e Agarwal, 2001), enquanto a albumina (pI 4,9, Putnam, 1975) e algumas IgGs ($6,3 < pI < 9,0$) apresentam carga negativa em pH 7,0. O tampão Tris, na ausência de sal, favorece a adsorção de albumina e de IgGs, que se apresentam com carga líquida negativa em pH 7,0, em PEVA-TREN-Ni(II), devido às interações eletrostáticas.

No que concerne aos adsorventes PEVA-IDA-Ni(II) e PEVA-CM-Asp-Ni(II), o tampão Tris-HCl também favoreceu maior adsorção de IgG humana (9,0 e 9,6 mg respectivamente) quando comparado aos outros tampões utilizados. Além disso, para estes adsorventes, este tampão desfavoreceu a adsorção de albumina, provavelmente, devido à repulsão eletrostática, apresentando bons resultados de seletividade. Os complexos IDA-Ni(II) e CM-Asp-Ni(II) não apresentam as mesmas características iônicas do complexo TREN-Ni(II) a pH 7,0. Ademais, o tampão Tris-HCl (pKa 8,3, Serpa, 2002) em pH 7,0, é carregado positivamente. A albumina, carregada negativamente neste pH, pode estar interagindo eletrostaticamente com o Tris, não se ligando, portanto, ao íon níquel imobilizado (Anexos E e F). O complexo CM-Asp-Ni(II) demonstrou maior capacidade para adsorção de IgG que o complexo IDA-Ni(II), assim como verificado no item 4.3

Quando utilizou-se o tampão Tris acrescido de NaCl, o adsorvente PEVA-TREN-Ni(II) apresentou, como mostrado para os tampões MA e Mops acrescidos de NaCl, baixa capacidade de adsorção de IgG (0,2 mg), porém maior seletividade e forte retenção. Para este adsorvente, a IgG foi detectada somente nas frações de regeneração. A presença de albumina não foi detectada nem por análise nefelométrica, nem por eletroforese SDS-PAGE (Anexos G e H). Tais resultados comprovam a hipótese formulada que a albumina deve interagir eletrostaticamente com PEVA-TREN-Ni(II) quando em presença do tampão de baixa força iônica Tris-HCl (ausência de NaCl). Os adsorventes PEVA-IDA-Ni(II) e

PEVA-CM-Asp-Ni(II), quando da utilização do tampão Tris-HCl contendo NaCl, apresentaram contaminação por albumina e outras proteínas do plasma humano nas frações de eluição, segundo eletroforese SDS-PAGE (Anexo G). Para o adsorvente PEVA-IDA-Ni(II), a capacidade de adsorção de IgG diminuiu ligeiramente em tampão Tris-HCl acrescido de NaCl, quando comparada ao tampão MA acrescido de NaCl. Para os adsorventes PEVA-TREN-Ni(II) e PEVA-CM-Asp-Ni(II), esta diminuição foi significativa. O tampão Tris-HCl apresenta características de um competidor fraco devido à presença da amina primária em sua estrutura, podendo, desta forma, competir pelo sítio de adsorção com as proteínas.

Desta forma, verifica-se pela análise da Tabela 4.4, que o tampão Tris-HCl na ausência de NaCl proporcionou a maior adsorção de IgG para todos os adsorventes testados. A ausência de sal possibilitou a ocorrência de interações eletrostáticas entre a IgG e os adsorventes, aumentando, desta forma, a capacidade de adsorção do suporte.

Os tampões testados foram ordenados em relação à capacidade em adsorver IgG da seguinte forma: Tris-HCl > MA > Tris-HCl acrescido de NaCl > Mops com 2 mM imidazol.

Para os tampões de adsorção MA, Mops com 2 mM imidazol e Tris-HCl acrescido de NaCl, a ordem de capacidade para adsorção de proteínas do plasma humano e IgG em função dos agentes quelantes estudados foi: IDA > CM-Asp > TREN, conforme regra estabelecida por Porath, 1988 (IDA > CM-Asp). Para o tampão Tris-HCl em ausência de NaCl, a ordem foi estabelecida em CM-Asp > IDA > TREN, assim como verificado para a adsorção de IgG pré-purificada do item 4.1.3.

4.1.4.1. Melhor condição de purificação de IgG em PEVA-TREN-Ni(II)

A membrana PEVA-TREN-Ni(II) demonstrou baixa capacidade de adsorção de IgG a partir do plasma humano em presença de todos os tampões estudados. Segundo análise conjunta da eletroforese SDS-PAGE (Anexos A a H) e análise nefelométrica, o melhor resultado de purificação para este adsorvente foi com tampão MA. O cromatograma bem como a eletroforese para este experimento, são apresentados na Figura 4.5. A Tabela 4.5

apresenta o balanço de massa para proteína total, IgG, albumina e transferrina das frações cromatográficas.

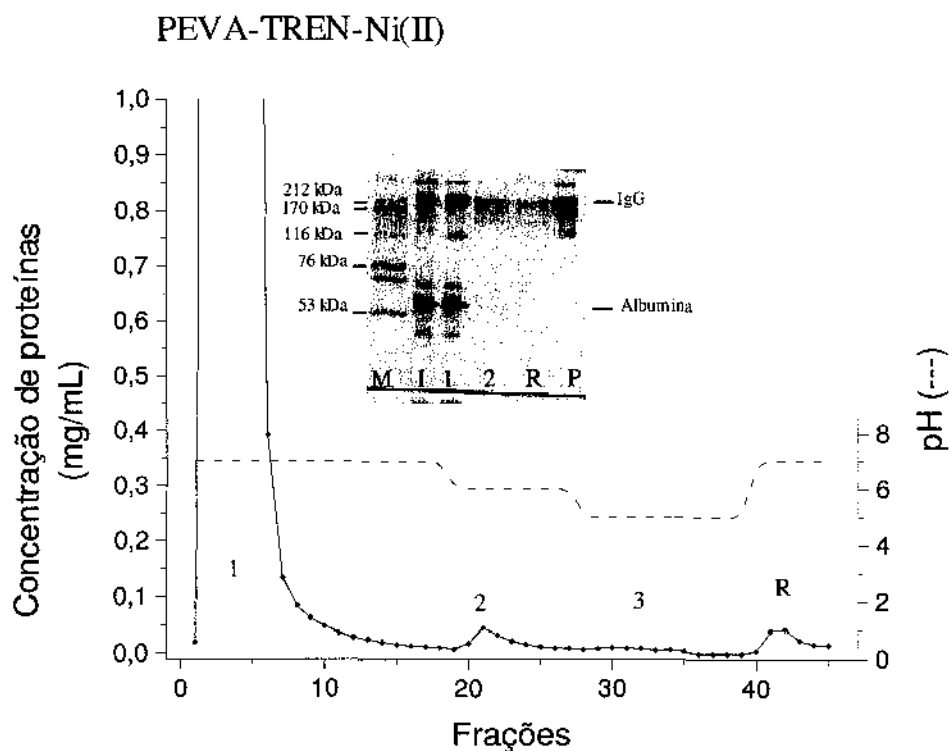


Figura 4.5: Cromatografias realizadas com solução de plasma humano em PEVA-TREN-Ni(II). Volume de leito: 5 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Tampão de adsorção: MA 25 mM, NaCl 1 M pH 7,0; dessorção: gradiente degrau pH 6,0, pH 5,0; regeneração: EDTA 100 mM pH 7,0. Eletroforeses: (M) marcador de alta massa molecular, (I) material injetado, (1-2) correspondente aos pontos enumerados do cromatograma, (R) regeneração, (P) IgG de alta pureza (Aventis).

Tabela 4.5: Purificação para IgG a partir do plasma humano em PEVA-TREN-Ni(II). Tampão de adsorção: MA 25 mM, NaCl 1 M pH 7,0.

		Proteína total ¹	IgG ²	AH ³	TRF ⁴	IgG/proteína total (mg/mg)	Fator de purificação
Injeção	(mg)	105,4	18,0	51,5	4,1	0,17	1,00
	(%)	100,0	100,0	100,0	100,0		
Lavagem	(mg)	117,1	17,6	54,7	4,1	0,15	0,88
	(%)	11,1	97,4	106,2	101,1		
Eluição	pH 6,0	(mg)	0,7	bt ⁵	bt ⁵	0,43	2,53
		(%)	0,6	0,0	0,0		
	pH 5,0	(mg)	0,2	bt ⁵	bt ⁵	-	-
		(%)	0,2	0,0	0,0		
Regeneração	(mg)	0,5	0,1	bt ⁵	bt ⁵	0,20	1,18
	(%)	0,5	0,6	0,0	0,0		
Recuperação	(mg)	117,9	17,9	54,7	4,1	-	-
	(%)	112,0	99,3	106,2	101,1		
Total adsorvido	(mg)	1,4	0,4	0,0	0,0	0,29	1,68
	(%)	1,4	2,3	0,0	0,0		

¹ dosagem pelo método de Bradford, 1975, ² IgG, imunoglobulina G, dosagem por nefelometria, ³ AH, albumina humana, dosagem por nefelometria, ⁴ TRF, transferrina, dosagem por nefelometria, ⁵bt, abaixo do limite detectável

O adsorvente PEVA-TREN-Ni(II) em presença do tampão MA apresentou baixa capacidade para adsorção de IgG, (adsorção de 2,3% da IgG injetada). Os melhores resultados de purificação são encontrados nas frações de eluição a pH 6,0, apresentando razão de IgG por proteína total de 0,43 e fator de purificação de 2,53.

4.1.4.2. Melhor condição de purificação de IgG em PEVA-IDA-Ni(II)

A membrana PEVA-IDA-Ni(II) demonstrou boa capacidade para adsorção de IgG a partir do plasma humano com todos os tampões estudados. Segundo análise conjunta da eletroforese SDS-PAGE (Anexos A a H) e análise nefelométrica, o melhor resultado de purificação foi encontrado utilizando-se o tampão Tris-HCl em ausência de NaCl. O

cromatograma para este experimento é apresentado na Figura 4.6. A Tabela 4.6 apresenta o balanço de massa para proteína total, IgG, albumina e transferrina das frações cromatográficas.

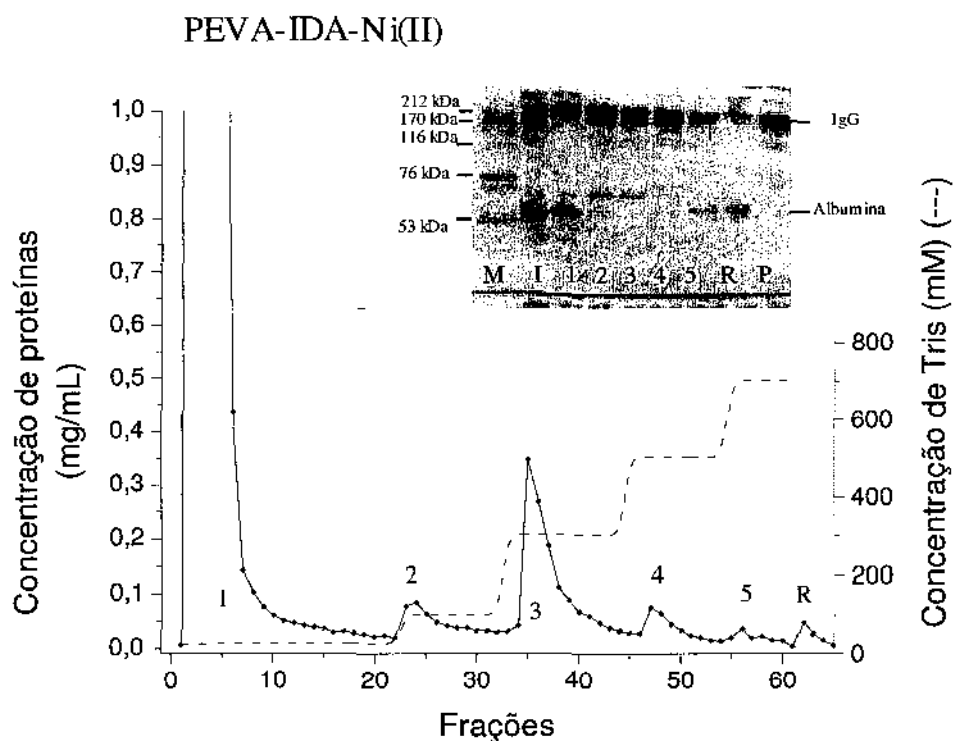


Figura 4.6: Cromatografias realizadas com solução de plasma humano em PEVA-IDA-Ni(II). Volume de leito: 5 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Tampão de adsorção: Tris-HCl 25 mM pH 7,0; dessorção: gradiente degrau do aumento da concentração de Tris 100, 300, 500 e 700 mM; regeneração: EDTA 100 mM pH 7,0. Eletroforeses: (M) marcador de alta massa molecular, (I) material injetado, (1-5) correspondente aos pontos enumerados do cromatograma, (R) regeneração, (P) IgG de alta pureza (Aventis).

Tabela 4.6: Purificação para IgG a partir do plasma humano em PEVA-IDA-Ni(II). Tampão de adsorção: Tris-HCl 25 mM pH 7,0.

		Proteína total ¹	IgG ²	AH ³	TRF ⁴	IgG/proteína total (mg/mg)	Fator de purificação
Injeção	(mg)	110,2	18,1	53,6	3,8	0,17	1
	(%)	100,0	100,0	100,0	100,0		
Lavagem	(mg)	110,3	11,0	59,8	3,2	0,10	0,59
	(%)	100,1	60,6	111,6	84,3		
Eluição	100 mM	(mg)	2,2	1,9	bt ⁵	0,86	5,06
		(%)	1,8	10,5	0,0		
	300 mM	(mg)	6,3	5,7	bt ⁵	0,90	5,29
		(%)	4,9	31,6	0,0		
	500 mM	(mg)	1,4	1,1	bt ⁵	0,79	4,65
		(%)	1,3	6,2	0,0		
	700 mM	(mg)	0,5	0,22	bt ⁵	0,44	2,58
		(%)	0,5	1,2	0,0		
Regeneração	(mg)	0,5	0,1	bt ⁵	bt ⁵	0,2	1,18
	(%)	0,4	0,4	0,0	0,0		
Recuperação	(mg)	121,3	20,1	59,8	4,1	-	-
	(%)	110,0	110,5	111,6	110,0		
Total adsorvido	(mg)	10,9	9,0	0,0	1,0	0,83	4,88
	(%)	8,8	49,5	0,0	25,3		

¹ dosagem pelo método de Bradford, 1975, ² IgG, imunoglobulina G, dosagem por nefelometria, ³ AH, albumina humana, dosagem por nefelometria, ⁴ TRF, transferrina, dosagem por nefelometria, ⁵bt, abaixo do limite detectável

Segundo os resultados apresentados, houve a adsorção de 49,5% da IgG injetada (uma razão de IgG por proteína total de 0,83mg/mg e um fator de purificação de 4,88). Os melhores resultados de purificação são encontrados nas frações de eluição a 100, 300 e 500 mM de Tris.

4.1.4.3. Melhor condição de purificação de IgG em PEVA-CM-Asp-Ni(II)

A membrana PEVA-CM-Asp-Ni(II) demonstrou boa capacidade para adsorção de IgG a partir do plasma humano quando em presença dos tampões MA e Tris-HCl em ausência de NaCl, porém apresentou baixa capacidade de adsorção quando em presença dos tampões contendo agente competitivo, Mops (imidazol) e Tris-HCl, ambos contendo NaCl. Segundo análise conjunta da eletroforese SDS-PAGE e análise nefelométrica, o melhor resultado de purificação para este adsorvente foi com tampão Tris-HCl em ausência de NaCl. O cromatograma para este experimento é apresentado na Figura 4.7. A Tabela 4.7 apresenta o balanço de massa para proteína total, IgG, albumina e transferrina das frações cromatográficas.

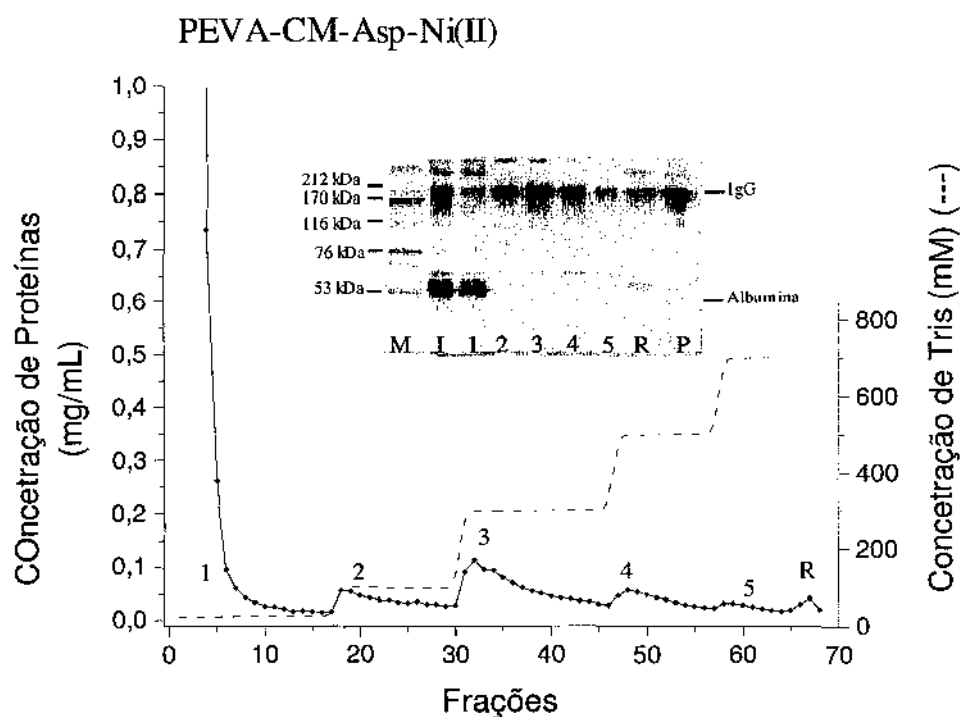


Figura 4.7: Cromatografias realizadas com solução de plasma humano PEVA-CM-Asp-Ni(II). Volume de leito: 5 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Tampão de adsorção: Tris-HCl 25 mM pH 7,0; dessorção: gradiente degrau do aumento da concentração de Tris 100, 300, 500 e 700 mM; regeneração: EDTA 100 mM pH 7,0. Eletroforeses: (M) marcador de alta massa molecular, (I) material injetado, (1-5) correspondente aos pontos enumerados do cromatograma, (R) regeneração, (P) IgG de alta pureza (Aventis).

Tabela 4.7: Purificação para IgG a partir do plasma humano em PEVA-CM-Asp-Ni(II).
Tampão de adsorção: Tris-HCl 25 mM pH 7,0.

		Proteína total ¹	IgG ²	AH ³	TRF ⁴	IgG/proteína total (mg/mg)	Fator de purificação
Injeção	(mg)	91,1	17,5	54,7	3,3		
	(%)	100,0	100,0	100,0	100,0	0,19	1,0
Lavagem	(mg)	89,6	7,2	57,3	1,9		
	(%)	98,3	41,1	104,6	57,8	0,10	0,53
Eluição	100 mM	(mg)	2,4	2,2	bt ⁵	bt ⁵	
		(%)	2,5	12,4	0,0	0,0	0,92
	300 mM	(mg)	5,5	4,9	bt ⁵	0,6	
		(%)	5,0	27,7	0,0	18,2	0,89
	500 mM	(mg)	2,0	1,6	bt ⁵	0,3	
		(%)	2,2	9,0	0,0	8,4	0,80
	700 mM	(mg)	0,9	0,6	bt ⁵	bt ⁵	
		(%)	0,9	3,5	0,0	0,0	0,67
Regeneração	(mg)	0,4	0,3	bt ⁵	bt ⁵		
	(%)	0,5	1,7	0,0	0,0	0,75	3,94
Recuperação	(mg)	100,8	16,7	57,3	2,8		
	(%)	110,6	95,3	104,6	8,5	-	-
Total adsorvido	(mg)	11,2	9,6	0,0	0,9		
	(%)	12,3	54,9	0,0	0,3	0,86	4,53

¹ dosagem pelo método de Bradford, 1975, ² IgG, imunoglobulina G, dosagem por nefelometria, ³ AH, albumina humana, dosagem por nefelometria, ⁴ TRF, transferrina, dosagem por nefelometria, ⁵bt, abaixo do limite detectável

A análise conjunta das frações de eluição indicam a purificação de 9,6 mg de IgG correspondendo a 54,9% da IgG injetada na coluna, uma razão de IgG por proteína total de 0,86 mg/mg e um fator de purificação de 4,53.

4.1.5. Purificação de IgG a partir de plasma humano utilizando-se géis tradicionais como matriz

Para comparar a eficiência dos adsorventes PEVA-AQ-Ni(II) para purificação de IgG, foram realizados experimentos cromatográficos com plasma humano utilizando-se géis tradicionais como matriz (gel de agarose). Os sistemas tamponantes utilizados foram aqueles que proporcionaram a melhor purificação de IgG em PEVA-IDA-Ni(II), PEVA-CM-Asp-Ni(II) e PEVA-TREN-Ni(II). Os resultados das cromatografias são apresentados nas Figuras 4.8 a 4.10. O balanço de massa para proteína total é apresentado nas Tabelas 4.8 e 4.9.

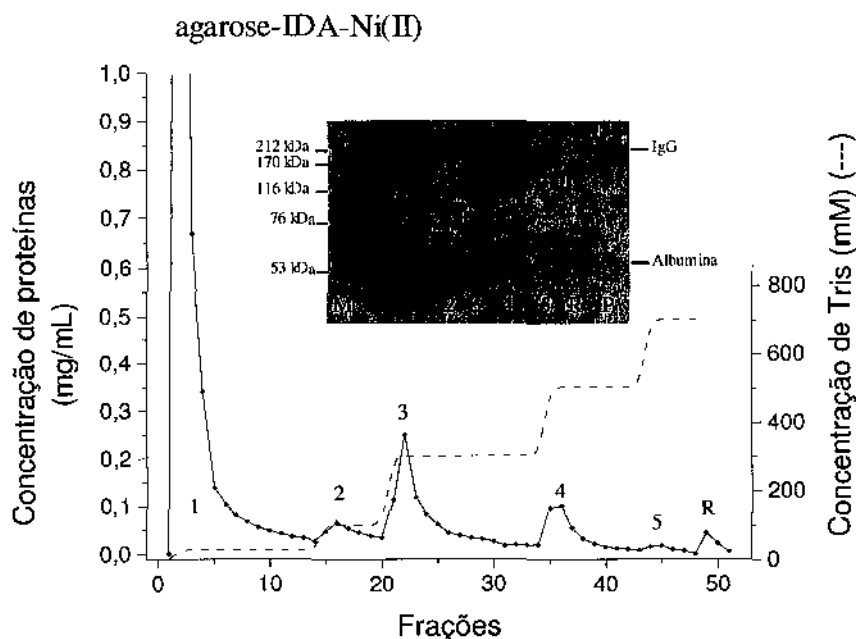


Figura 4.8: Cromatografias realizadas com solução de plasma humano em agarose-IDA-Ni(II). Volume de leito: 1 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Tampão de adsorção: Tris-HCl 25 mM, pH 7,0; dessorção: gradiente degrau do aumento da concentração de Tris 100, 300, 500 e 700 mM; Regeneração: 100 mM EDTA pH 7,0. Eletroforeses: (M) marcador de alta massa molecular, (I) material injetado, (1-5) correspondente aos pontos enumerados do cromatograma, (R) regeneração, (P) IgG de alta pureza (Aventis).

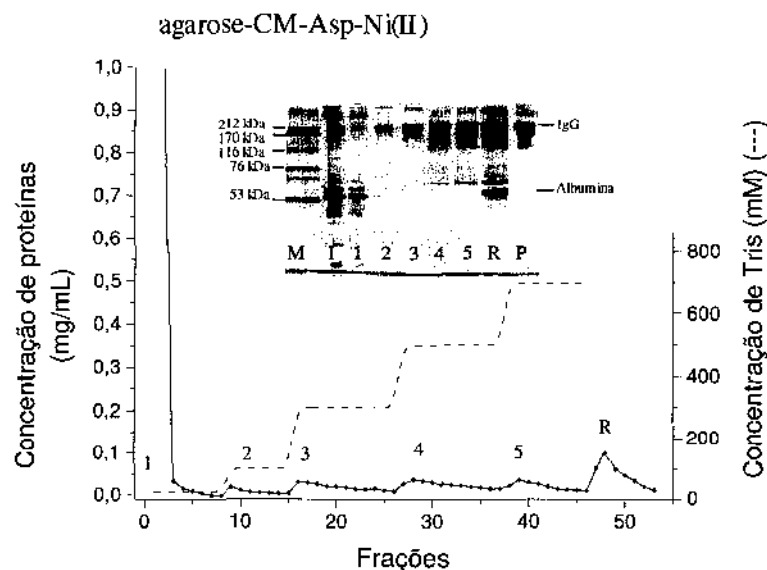


Figura 4.9: Cromatografias realizadas com solução de plasma humano em agarose-CM-Asp-Ni(II). Volume de leito: 1 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Tampão de adsorção: Tris-HCl 25 mM, pH 7,0; dessorção: gradiente degrau do aumento da concentração de Tris 100, 300, 500 e 700 mM. Regeneração: 100 mM EDTA pH 7,0. Eletroforeses: (M) marcador de alta massa molecular, (I) material injetado, (1-5) correspondente aos pontos enumerados do cromatograma, (R) regeneração, (P) IgG de alta pureza (Aventis).

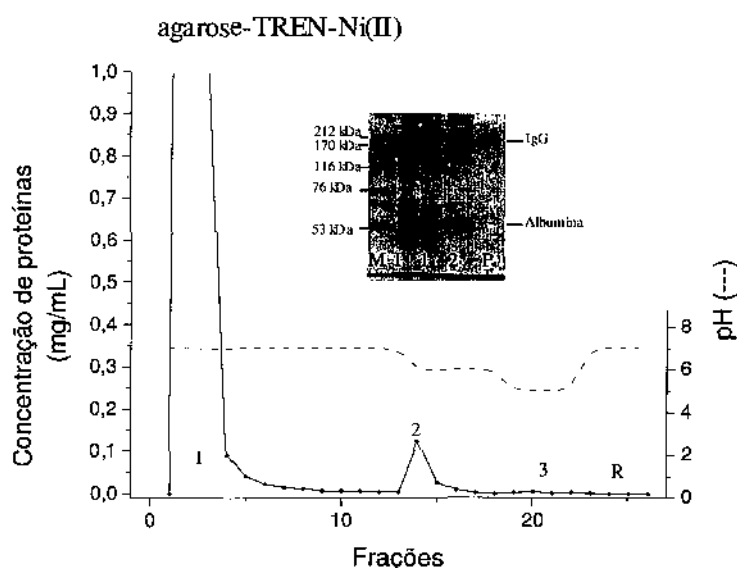


Figura 4.10: Cromatografias realizadas com solução de plasma humano agarose-TREN-Ni(II). Volume de leito: 1 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Tampão MA 25 mM, NaCl 1 M, pH 7,0; dessorção degrau de pH, pH 6,0, pH 5,0. Regeneração: 100 mM EDTA pH 7,0. Eletroforeses: (M) marcador de alta massa molecular, (I) material injetado, (1-5) correspondente aos pontos enumerados do cromatograma, (R) regeneração, (P) IgG de alta pureza (Aventis).

Tabela 4.8: Balanço de massa para proteína total para a purificação de IgG a partir de plasma humano utilizando tampão de adsorção Tris-HCl 25 mM, pH 7,0 e dessorção por gradiente degrau de Tris em agarose-IDA-Ni(II) e agarose-CM-Asp-Ni(II)

		Proteína total ¹	agarose-IDA- Ni(II)	agarose-CM-Asp- Ni(II)	
Injeção		(mg) (%)	25,8 100,0	29,1 100,0	
Lavagem		(mg) (%)	20,7 80,3	26,1 89,5	
Eluição	100 mM	(mg) (%)	1,1 4,3	0,2 0,7	
		300 mM	(mg) (%)	3,4 13,2	0,8 2,8
	500 mM		(mg) (%)	1,4 5,3	0,9 3,2
		700 mM	(mg) (%)	0,2 0,8	0,7 2,3
	Regeneração		(mg) (%)	0,3 1,2	1,3 4,3
	Recuperação		(mg) (%)	27,1 105,1	29,9 102,8
	Total adsorvido		(mg) (%)	6,4 24,8	3,9 13,3

¹ dosagem pelo método de Bradford, 1975.

Tabela 4.9: Balanço de massa para proteína total para a purificação de IgG a partir de plasma humano utilizando tampão de adsorção MA 25 mM NaCl 1 M pH 7,0 e dessorção por gradiente de pH em agarose-TREN-Ni(II)

		Proteína total ¹	Agarose-TREN-Ni(II)
		(mg)	26,5
Injeção		(%)	100,0
		(mg)	23,6
Lavagem		(%)	88,8
Eluição	pH 6,0	(mg)	0,7
		(%)	2,5
	pH 5,0	(mg)	0,0
		(%)	0,0
Regeneração		(mg)	0,0
		(%)	0,0
		(mg)	24,2
Recuperação		(%)	91,4
		(mg)	0,7
Total adsorvido		(%)	2,5

¹ dosagem pelo método de Bradford, 1975.

O gel agarose-IDA-Ni(II) e agarose-TREN-Ni(II) adsorveram maiores quantidades de proteínas que PEVA-IDA-Ni(II) e PEVA-TREN-Ni(II) (19,2 e 8,7 mg/ g de suporte seco para IDA-Ni(II) e 2,1 e 1,1 mg/g de suporte seco para TREN-Ni(II), respectivamente, para gel e membrana). Apesar da elevada capacidade dos géis de pseudoafinidade, segundo eletroforese SDS-PAGE, grandes quantidades de impurezas, principalmente albumina, foram adsorvidas neste suportes. A utilização do gel de agarose como suporte, neste caso, não proporcionou seletividade para a purificação de IgG a partir do plasma humano. A elevada capacidade desses géis de afinidade por proteínas pode ser explicada pela maior capacidade de níquel imobilizado (114,1 e 71,5 $\mu\text{mol/g}$ de suporte) em relação às membranas (78,2 e 25,4 $\mu\text{mol/g}$ de suporte). O maior tamanho dos poros oferecido pelos géis em relação às membranas finamente cortadas, favorece a transferência de massa

(transporte difusivo de moléculas ao sítio de adsorção), desta maneira, contribuindo, também, para o aumento de proteínas adsorvidas.

Para agarose-CM-Asp-Ni(II), segundo eletroforese SDS-PAGE, foram encontrados bons resultados de seletividade nas frações de eluição por aumento da concentração de Tris (100 e 300 mM de Tris). O complexo CM-Asp-Ni(II) e a albumina em pH 7,0 apresentam carga líquida negativa (Gaberc-Porekar e Menart, 2001 Putnam, 1975), podendo haver contribuição de interações eletrostáticas diminuindo a contaminação de albumina das frações de eluição. O gel agarose-CM-Asp-Ni(II), assim como a membrana PEVA-CM-Asp-Ni(II), apresentam potencialidade para serem utilizados como suporte para purificação de IgG a partir do plasma humano.

4.1.6. Experimentos de filtração nos mini-módulos de PEVA-IDA-Ni(II), PEVA-TREN-Ni(II) e PEVA-CM-Asp-Ni(II)

4.1.6.1. Avaliação da eficácia da imobilização dos agentes quelantes às membranas de PEVA em mini-módulos de filtração

Os mini-módulos foram construídos e as suas membranas derivatizadas conforme descrito no item 3.2.7. A eficácia da imobilização dos agentes quelantes IDA, CM-Asp e TREN às membranas de PEVA em mini-módulos de filtração foi determinada pela densidade do íon metálico cobre dos adsorventes. Os resultados indicaram uma densidade de metal cobre para PEVA-IDA, PEVA-CM-Asp e PEVA-TREN de 98,78, 53,15 e 57,85 $\mu\text{mol/g}$ seca de membrana, respectivamente (maior densidade de metal para as membranas contidas nos módulos do que para as mesmas finamente cortadas). Esses resultados se devem, possivelmente, ao método de ativação mais eficaz para as membranas em mini-módulos de filtração. Para os módulos, as soluções utilizadas para a derivatização das membranas foram alimentadas em modo tangencial. Este procedimento força a passagem das soluções pelo interior dos poros das membranas, favorecendo a transferência de massa até o interior dos poros e, conseqüentemente, a imobilização dos agentes quelantes de modo mais eficiente.

4.1.6.2. Experimentos de filtração utilizando IgG pré-purificada: PEVA-AQ-Cu(II)

Experimentos de filtração em modo tangencial utilizando-se IgG pré-purificada foram realizados em mini-módulos para determinação da curva de ruptura e determinação da capacidade dinâmica de adsorção de IgG a fim de comparar com a encontrada para as matrizes utilizando-se o íon metálico cobre em membranas finamente cortadas e gel de agarose (item 4.1.2). Os experimentos foram realizados como descrito nos itens 3.2.7.3. Uma solução de IgG a 10 mg/mL diluída no tampão de adsorção MA 25 mM, NaCl 1 M pH 7,0 foi alimentada a uma vazão de 1 mL/min e a vazão do filtrado de 0,5 mL/min. O tempo de residência foi calculado em 23,8 segundos. As curvas de ruptura para PEVA-IDA-Cu(II), PEVA-CM-Asp-Cu(II) e PEVA-TREN-Cu(II) são apresentadas na Figura 4.11.

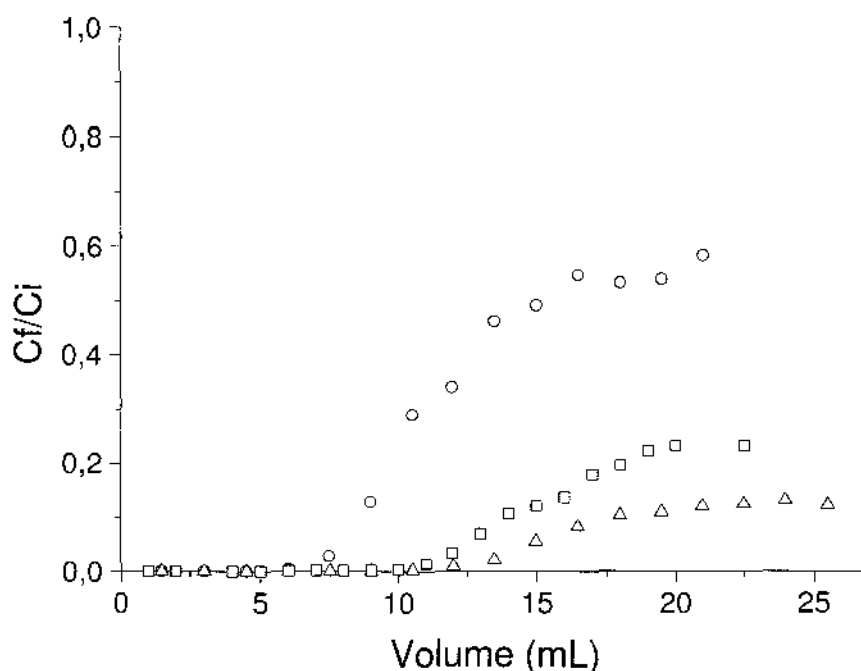


Figura 4.11: Curva de ruptura obtida para linha de filtrado. Alimentação IgG pré-purificada a 10 mg/mL. Vazão alimentação: 1 ml/min. Vazão filtrado: 0,5 ml/min. Cf/Ci: Razão entre a concentração de IgG no filtrado e a concentração de IgG inicial. (○) PEVA-TREN-Cu(II), (□) PEVA-CM-Asp-Cu(II) e (Δ) PEVA-IDA-Cu(II).

A eluição de IgG foi realizada após a lavagem dos módulos com tampão de adsorção, segundo procedimento exemplificado em 3.2.7.2. As quantidades de IgG adsorvidas foram 298,5, 262,3 e 52,9 mg/g seca de membrana (ou 568,35 , 458,63 e 100,55 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) para PEVA-IDA-Cu(II), PEVA-CM-Asp-Cu(II) e PEVA-TREN-Cu(II), respectivamente.

As curvas de ruptura apresentadas na Figura 4.11 mostram que a concentração de IgG no filtrado aumenta até atingir um valor estacionário para Cf/Ci de 0,12, 0,23 e 0,53 para PEVA-IDA-Cu(II), PEVA-CM-Asp-Cu(II) e PEVA-TREN-Cu(II), respectivamente. O menor valor de Cf/Ci encontrado para PEVA-IDA-Cu(II) e PEVA-CM-Asp-Cu(II) pode ser explicado pela sua alta capacidade de adsorção. O grande número de moléculas de IgG adsorvidas nos poros das membranas pode dificultar a passagem de outras moléculas de IgG e, conseqüentemente, diminuir a concentração de IgG nas frações de filtrado. Nos processos industriais de purificação de proteínas é desejável minimizar a perda de produto na corrente do filtrado durante a etapa de alimentação. Desta forma, a alimentação deve ser cessada no momento em que a proteína alvo começa a ser detectada no efluente (ponto de ruptura). Definindo-se o ponto de ruptura em Cf/Ci igual a 0,1 (como descrito por Charcosset *et al*, 1995), verifica-se que este ocorreu após a passagem de 9, 14 e 16 mL de solução de plasma na linha do filtrado, ou seja, após 18, 28 e 32 min de alimentação para PEVA-TREN-Cu(II), PEVA-CM-Asp-Cu(II) e PEVA-IDA-Cu(II), respectivamente.

Comparando-se os resultados de capacidade dinâmica de adsorção de IgG com os obtidos no item 4.1.2, verifica-se que a capacidade dinâmica de adsorção de IgG para as membranas em mini-módulos de filtração é de quatro a cinco vezes maiores, quando comparados as membranas finamente cortadas (9,2 e 52,9 mg/g seca de membrana para TREN-Ni(II), 60,8 e 262,3 mg/g seca de membrana para CM-Asp-Cu(II) e 73,3 e 298,5 mg/g seca de membrana para IDA-Ni(II), respectivamente para membranas finamente cortada e mini-módulo). Esses resultados se devem à maior densidade de metal encontrada nas membranas em mini-módulos de filtração e ainda à maior facilidade das proteínas de IgG em se mover para o interior dos poros, devido ao transporte convectivo, favorecendo a transferência de massa.

4.1.6.3. Experimentos de filtração para purificação de IgG a partir do plasma humano: PEVA-AQ-Ni(II)

Foram realizados experimentos de filtração para a determinação das curvas de ruptura e capacidade dinâmica em adsorver IgG a partir de solução de plasma humano. O mini-módulo de filtração foi alimentado em modo tangencial com solução de plasma humano diluído 1:5 em tampão de adsorção, contendo 8,8 a 13,3 mg/mL de proteínas totais, 0,6 a 0,7 mg/mL de IgA, 2 a 2,2 mg/mL de IgG, 0,26 a 0,28 mg/mL de IgM, 5,5 a 6,7 mg/mL de albumina e 0,3 e 0,5 mg/mL de transferrina. A relação vazão de filtrado (Q_f) por vazão de alimentação (Q_i) foi mantida constante em 0,5 (Serpa, 2002). Foi utilizado o modo de filtração tangencial na etapa de alimentação para evitar a colmatagem das membranas. Os experimentos foram realizados utilizando-se as melhores condições tamponantes encontradas no item 4.1.4 para cada adsorvente (Tris-HCl 25 mM pH 7,0 para PEVA-IDA-Ni(II) e PEVA-CM-Asp-Ni(II) e MA 25 mM, NaCl 1M pH 7,0 para PEVA-TREN-Ni(II))

PEVA-TREN-NI(II)

A Figura 4.12 ilustra a curva de ruptura injetando-se solução de plasma até a saturação do módulo. Utilizou-se Q_i de 1 mL/min e Q_f de 0,5 mL/min (tempo de residência de 23,8 segundos).

Segundo eletroforese da Figura 4.12, para PEVA-TREN-Ni(II) detecta-se perda de IgG pela linha de filtrado após 4 mL de alimentação. Definindo-se o ponto de ruptura para proteína total em C_f/C_i igual a 0,1 (Charcosset *et al*, 1995), verifica-se que este ocorreu após a passagem de 6 mL de solução de plasma na linha de filtrado ou após 12 min de alimentação. A concentração de proteínas no filtrado aumenta até atingir um valor estacionário para C_f/C_i próximo a 0,6.

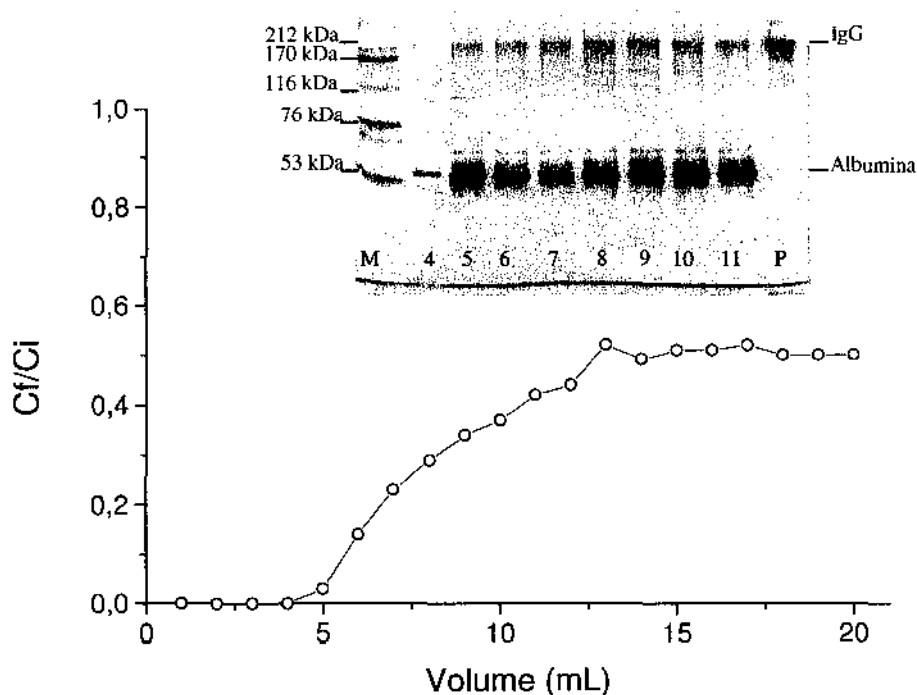


Figura 4.12: Curva de ruptura obtida para PEVA-TREN-Ni(II). Vazão de filtrado, $Q_F = 0,5$ mL/min. MA 25 mM, NaCl 1 M pH 7,0. Eletroforese das frações de filtrado: Faixas: (M) marcadores de alta massa molecular; (4-11) correspondentes aos pontos da curva de ruptura; (P) IgG de alta pureza (Aventis).

A eluição das proteínas adsorvidas foi realizada após a lavagem dos módulos com tampão de adsorção, segundo procedimento exemplificado em 3.2.7, ou seja, para PEVA-TREN-Ni(II), a eluição foi realizada por abaixamento de pH. O perfil de eluição é mostrado nas Figuras 4.13 e o balanço de massa para proteína total e das análises nefelométricas para IgG, albumina e transferrina são apresentadas na Tabela 4.10.

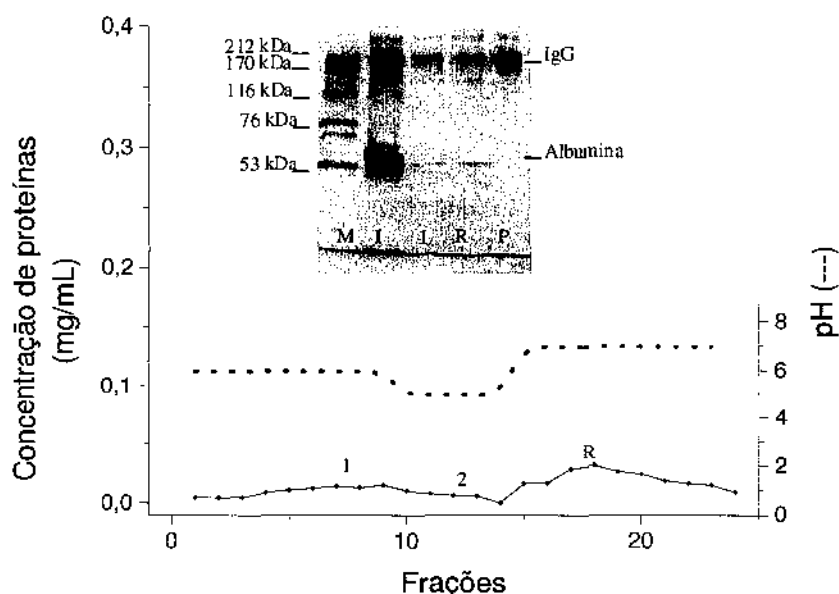


Figura 4.13: Perfil cromatográfico da etapa de eluição do experimento de filtração realizado com solução de plasma humano em PEVA-TREN-Ni(II). Q_I : 1,0 mL/min; Q_F : 0,5 mL/min. Tampão de adsorção: MA 25 mM, NaCl 1M pH 7,0; dessorção: gradiente degrau pH 6,0, pH 5,0; regeneração: EDTA 100 mM pH 7,0. Eletroforeses: (M) marcador de alta massa molecular, (I) material injetado, (1-2) correspondente aos pontos enumerados do cromatograma, (R) regeneração, (P) IgG de alta pureza (Aventis).

Tabela 4.10: Purificação para IgG a partir do plasma humano em mini-módulo de filtração PEVA-TREN-Ni(II). Tampão de adsorção: MA 25 mM NaCl 1 M pH 7,0.

			Proteína total ¹	IgG ²	AH ³	TRF ⁴	IgG/proteína total (mg/mg)
Eluição	pH 6,0	(mg)	0,4	bt ⁵	bt ⁵	bt ⁵	-
	pH 5,0	(mg)	0,1	bt ⁵	bt ⁵	bt ⁵	-
Regeneração		(mg)	0,7	bt ⁵	bt ⁵	bt ⁵	-
Total adsorvido		(mg)	1,2	0,0	0,0	0,0	-

¹ dosagem pelo método de Bradford, 1975, ² IgG, imunoglobulina G, dosagem por nefelometria, ³ AH, albumina humana, dosagem por nefelometria, ⁴ TRF, transferrina, dosagem por nefelometria, ⁵bt, abaixo do limite detectável.

Para PEVA-TREN-Ni(II), baixas quantidades de proteínas foram adsorvidas. Embora a análise nefelométrica não aponte IgG e albumina nas frações de eluição e regeneração, a eletroforese SDS-PAGE indica a presença de IgG e de pequena contaminação por albumina. Comparando-se os experimentos realizados com membranas em mini-módulo de filtração com aqueles realizados em membranas finamente cortadas, para PEVA-TREN-Ni(II), piores resultados de purificação foram encontrados para os experimentos realizados em módulo. Para este caso, os experimentos realizados em módulo não aumentaram a quantidade de proteínas adsorvidas e ainda, a análise nefelométrica não conseguiu acusar a presença de IgG, provavelmente, devido ao fato das amostras serem muito diluídas. Devido à baixa capacidade deste adsorvente, outras vazões de filtração e tempos de residência não foram estudados. Este adsorvente não foi selecionado para dar continuidade aos experimentos.

PEVA-IDA-NI(II)

A Figura 4.14 ilustra a curva de ruptura injetando-se solução de plasma até a saturação do módulo PEVA-IDA-Ni(II). Utilizou-se, neste caso, duas vazões diferentes: Q_I de 1 mL/min e Q_F de 0,5 mL/min (tempo de residência igual a 23,9 s) e Q_I de 1,4 mL/min e Q_F de 0,7 mL/min (tempo de residência de 17,1 s). Os tempos de residência empregados, quando aplicados a módulos comerciais de área correspondendo a 2 m², fornecem altos valores de vazões de filtrado (tempos de residência 23,9 s e 17,1 s correspondendo a 88,4 mL/min e 123,5 mL/min, respectivamente) (Anexo N).

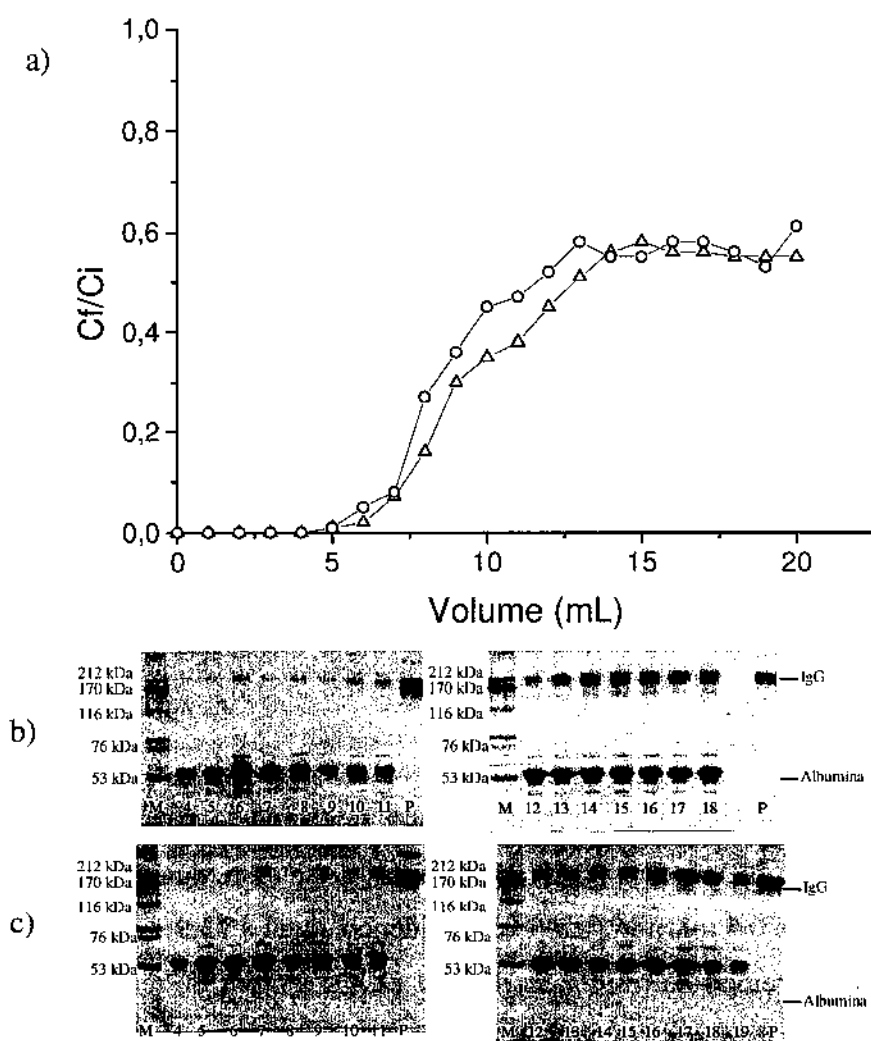


Figura 4.14: a) Curva de ruptura obtida para PEVA-IDA-Ni(II). Vazão do filtrado: (Δ) $Q_F = 0,5$ mL/min e ($\circ$) $Q_F = 0,7$ mL/min . Tampão de adsorção: Tris-HCl 25 mM pH 7,0. Eletroforese das frações de filtrado b) $Q_F = 0,5$ mL/min e c) $Q_F = 0,7$ mL/min : Faixas: (M) marcadores de alta massa molecular; (4-19) correspondentes aos pontos da curva de ruptura; (P) IgG de alta pureza (Aventis)

Segundo eletroforese da Figura 4.14, para PEVA-IDA-Ni(II), a IgG começa a sair na linha do filtrado, para as ambas as vazões, a partir de um volume de filtrado de 5 mL, porém, definindo-se o ponto de ruptura para proteína total em C_f/C_i igual a 0,1 (Charcosset *et al*, 1995), verifica-se que este ocorreu após a passagem de 7 e 7,5 mL de solução de

plasma na linha de filtrado ou após 14 e 15 min de alimentação para Q_F igual a 0,7 e 0,5 mL/min respectivamente. Observa-se também que a concentração de proteínas no filtrado aumenta até atingir um valor estacionário para C_f/C_i próximo a 0,6. As curvas de ruptura para proteína total variaram ligeiramente com a vazão. Observa-se que a razão C_f/C_i para proteína total da Figura 4.14 é maior para a vazão de 0,7 mL/min até atingir o valor estacionário 0,6.

A eluição das proteínas adsorvidas foi realizada após a lavagem dos módulos com tampão de adsorção, segundo procedimento exemplificado em 3.2.7. Para PEVA-IDA-Ni(II), a eluição foi realizada por aumento da concentração de Tris a 100, 300, 500 e 700 mM. O perfil de eluição para as duas vazões é mostrado na Figuras 4.15 e o balanço de massa para proteína total e das análises nefelométricas para IgG, albumina e transferrina são apresentadas nas Tabelas 4.11.

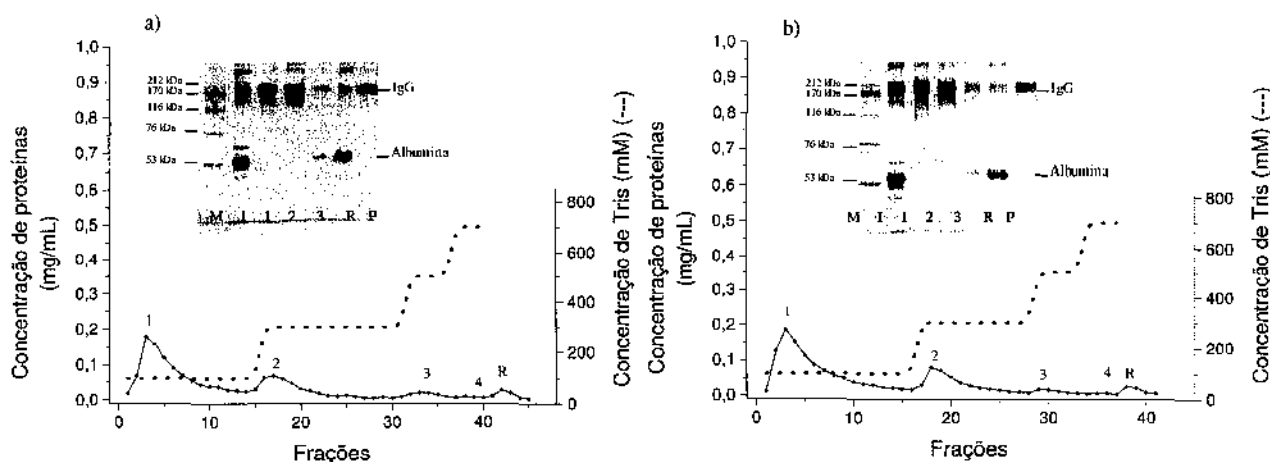


Figura 4.15: Perfil cromatográfico da etapa de eluição do experimento de filtração realizado com solução de plasma humano em PEVA-IDA-Ni(II). a) Q_F : 0,5 mL/min e b) Q_F : 0,7 mL/min. Tampão de adsorção: Tris-HCl 25 mM pH 7,0; dessorção: gradiente degrau do aumento da concentração de Tris 100, 300, 500 e 700 mM; regeneração: EDTA 100 mM pH 7,0. Eletroforeses: (M) marcador de alta massa molecular, (I) material injetado, (1-3) correspondente aos pontos enumerados do cromatograma, (R) regeneração, (P) IgG de alta pureza (Aventis).

Tabela 4.11: Purificação de IgG a partir do plasma humano em mini-módulo de filtração PEVA-IDA-Ni(II). Tampão de adsorção: Tris-HCl 25 mM pH 7,0.

		Proteína total ¹		IgG ²		AH ³		TRF ⁴		IgG/proteína total (mg/mg)	
Q _F (mL/min)		0,5	0,7	0,5	0,7	0,5	0,7	0,5	0,7	0,5	0,7
Eluição	100 mM (mg)	6,7	7,2	6,6	7,2	bt ⁵	bt ⁵	bt ⁵	bt ⁵	0,99	1,00
	300 mM (mg)	2,0	2,1	1,9	2,0	bt ⁵	bt ⁵	bt ⁵	bt ⁵	0,95	0,95
	500 mM (mg)	0,3	0,3	bt ⁵	0,1	bt ⁵	bt ⁵	bt ⁵	bt ⁵	-	0,33
	700 mM (mg)	0,2	0,1	bt ⁵	bt ⁵	bt ⁵	bt ⁵	bt ⁵	bt ⁵	-	-
Regeneração (mg)		0,3	0,3	bt ⁵	bt ⁵	bt ⁵	bt ⁵	bt ⁵	bt ⁵	-	-
Total adsorvido (mg)		9,5	10,0	8,5	9,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,89	0,93

¹ dosagem pelo método de Bradford, 1975, ² IgG, imunoglobulina G, dosagem por nefelometria, ³ AH, albumina humana, dosagem por nefelometria, ⁴ TRF, transferrina, dosagem por nefelometria, ⁵bt, abaixo do limite detectável

Segundo as eletroforeses apresentadas na Figura 4.15 houve pequena contaminação por albumina nas frações de eluição a 700 mM e de regeneração, embora a quantidade desta proteína esteja abaixo do limite detectável pela análise nefelométrica. Os resultados apresentados demonstram a adsorção de 8,5 e 9,3 mg de IgG, correspondendo a uma razão de IgG por proteína total de 0,89 e 0,93 mg/mg para Q_F igual a 0,5 e 0,7 mL/min, respectivamente. Houve quantidade de IgG adsorvida para o experimento realizado utilizando-se Q_F de 0,7 mL/min ligeiramente superior ao experimento utilizando-se Q_F de 0,5 mL/min.

Para PEVA-IDA-Ni(II), a comparação entre os experimentos realizados utilizando-se as membranas em mini-módulos de filtração com aqueles utilizando-se membranas finamente cortadas são apresentados na Tabela 4.12.

Tabela 4.12: Comparação entre os experimentos de adsorção realizados em PEVA-IDA-Ni(II) utilizando-se membranas finamente cortadas e membranas em mini-módulo de filtração.

Proteínas Eluídas	Membranas em mini-módulo de filtração (mg/g)		Membranas finamente cortadas (mg/g)
Q _F (mL/min)	0,5	0,7	
Proteína Total	45,4	47,8	8,7
IgG ²	40,6	44,5	7,2
AH ³	bt ⁵	bt ⁵	bt ⁵
TRF ⁴	bt ⁵	bt ⁵	0,8
IgG / proteína total (mg/mg)	0,89	0,93	0,83

¹ dosagem pelo método de Bradford, 1975, ² IgG, imunoglobulina G, dosagem por nefelometria, ³ AH, albumina humana, dosagem por nefelometria, ⁴ TRF, transferrina, dosagem por nefelometria, ⁵bt, abaixo do limite detectável.

Verifica-se apartir dos resultados, que a seletividade para a adsorção de IgG a partir do plasma humano para as membranas em mini-módulo de filtração mostrou-se diferente da seletividade apresentada pelas membranas finamente cortadas. Os experimentos em módulo não apresentaram contaminação por transferrina enquanto as membranas finamente cortadas apresentaram contaminação por esta proteína. A densidade de ligantes imobilizado (maior para as membranas em módulos), bem como o modo operacional, provavelmente, provocam as diferenças de seletividade observada. Ademais, possivelmente, a IgG tenha preferência na adsorção em IDA-Ni(II) em relação à transferrina. Porém, nas membranas cortadas, as proteínas chegam ao sítio de adsorção, localizado nos poros das membranas, por difusão, como a IgG (150 kDa) é maior que a transferrina (76 kDa), talvez a transferrina seja favorecida pelo transporte difusivo ao sítio de ligação provocando a sua adsorção. A IgG não estaria em concentração suficiente, no interior dos poros, para impedir a adsorção da transferrina. Nos módulos, as moléculas de IgG são forçadas a passarem pelos poros das membranas contendo o sítio de ligação, favorecendo a adsorção de IgG em relação à transferrina. O transporte convectivo estaria favorecendo a adsorção de IgG em detrimento da transferrina. Todavia, testes de seletividade utilizando-se membranas de

PEVA-IDA-Ni(II) em presença de transferrina e de IgG a diferentes concentrações devem ser realizados para comprovar esta teoria.

Observou-se igualmente que o perfil de eluição para ambos os sistemas se diferiram, enquanto para as membranas cortadas o maior pico de eluição se deu à concentração de Tris 300 mM, para o módulo o maior pico se deu a 100 mM. Nos processos de adsorção de proteínas em IMAC, muitas vezes, devido ao tamanho das proteínas envolvidas e da mobilidade estérica das mesmas, mais de um íon metálico pode participar da retenção de uma mesma proteína (proporcionando multipontos de interação com a proteína, e, conseqüentemente, forte retenção da mesma), ou, um único íon metálico pode participar da retenção de apenas uma proteína (diminuindo a força de retenção da proteína ao adsorvente) (Gaberc-Porekar e Menart, 2001). As proteínas são, então, capturadas com forças de retenção diferenciadas. Nos experimentos realizados em módulo, um maior número de IgGs entram em contato com o sítio de adsorção, graças ao transporte convectivo, e podem estar sendo adsorvidas em maiores quantidades em menores números de ligações de coordenação com o íon metálico que nos experimentos realizados com membranas finamente cortadas. Assim, há uma maior quantidade de IgG fracamente adsorvida nos módulos sendo removida logo nas primeiras frações de eluição à concentração de Tris 100 mM.

Para os sistemas utilizando-se o módulo e as membranas finamente cortadas, a razão média IgG por proteína total adsorvida no módulo foi de 0,91 e para as membranas finamente cortadas foi de 0,83 mg/mg, apresentando maior valor para o módulo, demonstrando a maior seletividade para purificação de IgG a partir do plasma humano. Além disso, as membranas em módulos de filtração apresentaram capacidade de adsorção de IgG cinco a seis vezes maior que as membranas finamente cortadas, indicando a viabilidade da utilização dos módulos de filtração.

PEVA-CM-Asp-Ni(II)

A Figura 4.16 ilustra a curva de ruptura injetando-se solução de plasma até a saturação do módulo. Utilizou-se neste caso duas vazões diferentes: Q_1 igual a 1 mL/min e

Q_F igual a 0,5 mL/min (tempo de residência 23,9 s) e Q_I igual a 1,4 mL/min e Q_F igual a 0,7 mL/min (tempo de residência 17,1 s) .

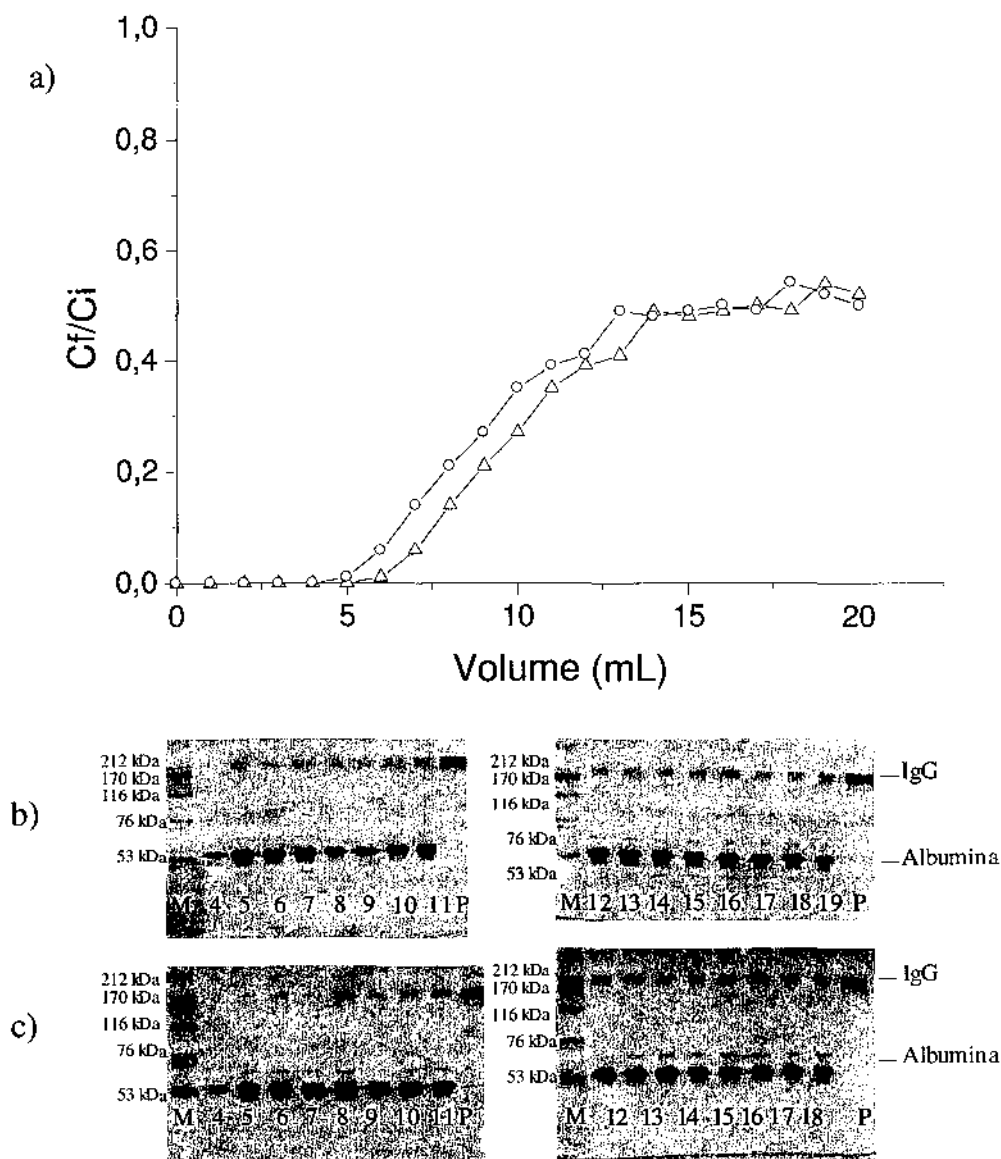


Figura 4.16: a) Curva de ruptura obtida para PEVA-CM-Asp-Ni(II). Vazão do filtrado: (Δ) $Q_F = 0,5$ mL/min e ($\circ$) $Q_F = 0,7$ mL/min . Tampão de adsorção: Tris-HCl 25 mM pH 7,0. Eletroforese das frações de filtrado b) $Q_F = 0,5$ mL/min e c) $Q_F = 0,7$ mL/min : Faixas: (M) marcadores de alta massa molecular; (4-19) correspondentes aos pontos da curva de ruptura; (P) IgG de alta pureza (Aventis).

Segundo eletroforese da Figura 4.16, a IgG começa a sair na linha do filtrado para ambas as vazões a partir de um volume de alimentação de 5 mL, porém, definindo-se o ponto de ruptura para proteína total em C_f/C_i igual a 0,1 (Charcosset *et al*, 1995), verifica-se que este ocorreu após a passagem de 7 e 7,5 mL de solução de plasma na linha de filtrado ou após 14 e 15 min de alimentação para Q_F igual a 0,7 e 0,5 mL/min, respectivamente. Observa-se também que a concentração de proteínas no filtrado aumenta até atingir um valor estacionário para C_f/C_i próximo a 0,6. As curvas de ruptura para proteína total variaram ligeiramente com a vazão. Observa-se que a razão C_f/C_i para proteína total é maior para a vazão de 0,7 mL/min até atingir o valor estacionário 0,6.

A eluição das proteínas adsorvidas foi realizada após a lavagem dos módulos com tampão de adsorção, segundo procedimento exemplificado em 3.2.7. Para PEVA-CM-Asp-Ni(II), a eluição foi realizada por aumento da concentração de Tris a 100, 300, 500 e 700 mM. O perfil de eluição para as duas vazões é mostrado nas Figuras 4.17 e o balanço de massa para proteína total e das análises nefelométricas para IgG, albumina e transferrina são apresentadas na Tabela 4.13.

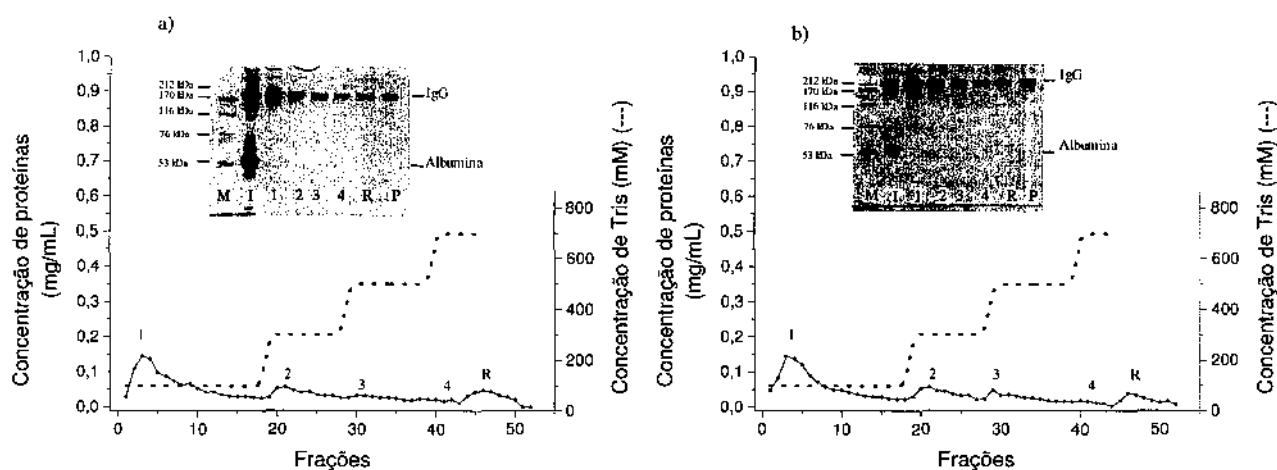


Figura 4.17: Perfil cromatográfico da etapa de eluição do experimento de filtração realizado com solução de plasma humano em PEVA-CM-Asp-Ni(II). a) Q_F : 0,5 mL/min e b) Q_F : 0,7 mL/min. Tampão de adsorção: Tris-HCl 25 mM pH 7,0; dessorção: gradiente degrau do aumento da concentração de Tris 100, 300, 500 e 700 mM; regeneração: EDTA 100 mM pH 7,0. Eletroforeses: (M) marcador de alta massa molecular, (I) material injetado, (1-3) correspondente aos pontos enumerados do cromatograma, (R) regeneração, (P) IgG de alta pureza (Aventis).

Tabela 4.13: Purificação de IgG a partir do plasma humano em mini-módulos de filtração PEVA-CM-Asp-Ni(II). Tampão de adsorção: Tris-HCl 25 mM pH 7,0.

			Proteína total ¹		IgG ²		AH ³		TRF ⁴		IgG/proteína total (mg/mg)	
Q _F (mL/min)			0,5	0,7	0,5	0,7	0,5	0,7	0,5	0,7	0,5	0,7
Eluição	100 mM	(mg)	6,2	6,6	6,1	6,6	bt ⁵	bt ⁵	bt ⁵	bt ⁵	0,98	1,00
	300 mM	(mg)	2,4	2,7	2,3	2,6	bt ⁵	bt ⁵	bt ⁵	bt ⁵	0,95	0,96
	500 mM	(mg)	1,5	1,7	1,3	1,3	bt ⁵	bt ⁵	bt ⁵	bt ⁵	0,87	0,76
	700 mM	(mg)	1,1	0,6	0,6	0,2	bt ⁵	bt ⁵	bt ⁵	bt ⁵	0,27	0,33
Regeneração		(mg)	0,9	1,0	0,7	0,5	bt ⁵	bt ⁵	bt ⁵	bt ⁵	0,78	0,50
Total adsorvido		(mg)	12,1	12,6	11,0	11,20	0,0	0,0	0,0	0,0	0,91	0,89

¹ dosagem pelo método de Bradford, 1975, ² IgG, imunoglobulina G, dosagem por nefelometria, ³ AH, albumina humana, dosagem por nefelometria, ⁴ TRF, transferrina, dosagem por nefelometria, ⁵ bt, abaixo do limite detectável

Segundo as eletroforeses apresentadas na Figura 4.17, houve pouca contaminação por outras proteínas do plasma humano. As quantidades de albumina e transferrina estão abaixo do limite detectável pela análise nefelométrica. Os resultados apresentados demonstram a adsorção de 11,0 e 11,2 mg de IgG, correspondendo a uma razão de IgG por proteína total de 0,90 e 0,89 mg/mg para Q_F igual a 0,5 e 0,7 mL/min, respectivamente. Neste caso, houve quantidades similares de IgG adsorvida para ambas as vazões.

Para PEVA-CM-Asp-Ni(II), a comparação entre os experimentos realizados utilizando-se membranas em mini-módulos de filtração com aqueles utilizando-se membranas finamente cortadas são apresentados na Tabela 4.14.

Tabela 4.14: Comparação entre os experimentos de adsorção realizados em PEVA-CM-Asp-Ni(II) utilizando-se membranas finamente cortadas e membranas em mini-módulo de filtração.

Proteínas Eluídas	Membranas em mini-módulo de filtração (mg/g)		Membranas finamente cortadas (mg/g)
Q _F (mL/min)	0,5	0,7	-
Proteína Total	57,9	60,3	9,0
IgG ²	52,6	53,6	7,7
AH ³	bt ⁵	bt ⁵	bt ⁵
TRF ⁴	bt ⁵	bt ⁵	0,7
IgG / proteína total (mg/mg)	0,91	0,89	0,86

¹ dosagem pelo método de Bradford, 1975, ² IgG, imunoglobulina G, dosagem por nefelometria, ³ AH, albumina humana, dosagem por nefelometria, ⁴ TRF, transferrina, dosagem por nefelometria, ⁵bt, abaixo do limite detectável.

Verifica-se a partir dos resultados, que a seletividade para a adsorção de IgG a partir do plasma humano para as membranas em mini-módulo de filtração mostrou-se diferente da daquela apresentada pelas membranas finamente cortadas, assim como verificado para IDA-Ni(II). Os experimentos em módulo não apresentaram contaminação por transferrina, enquanto as membranas finamente cortadas apresentaram contaminação por esta proteína. As mesmas explicações apresentadas para IDA-Ni(II) cabem aqui para CM-Asp-Ni(II).

Para os sistemas utilizando o módulo, a razão média de IgG por proteína total adsorvida foi de 0,90 e para as membranas cortadas foi de 0,86 mg/mg, apresentando maior valor para o módulo, demonstrando a maior seletividade para a purificação de IgG a partir do plasma humano. Além disso, as membranas em módulos de filtração apresentaram capacidade de adsorção de IgG seis a sete vezes maior que as membranas finamente cortadas, indicando a viabilidade da utilização dos módulos.

Os resultados apresentados pelo módulo PEVA-CM-Asp-Ni(II) apresentaram resultados de purificação superiores ao apresentado pelo módulo PEVA-IDA-Ni(II). Embora a razão média IgG proteína total para ambos sistemas tenham sido semelhantes, segundo as eletroforese das frações de eluição houve menos contaminação por outras

proteínas do plasma humano em CM-Asp-Ni(II) e maiores quantidades de IgG adsorvidas que o apresentado por IDA-Ni(II).

Os resultados apresentados demonstraram a grande potencialidade do emprego desta técnica para purificação de IgG a partir do plasma humano. Conseguiu-se purificar IgG com aproximadamente 90% de grau de pureza, em uma única etapa, utilizando-se ligante pseudobioespecífico, os íons metálicos imobilizados, que apresentam estabilidade química e física, são mais simples, mais baratos, de mais fácil escalonamento que os ligantes bioespecíficos. Em relação aos ligantes bioespecíficos proteínas A e G (Anexo L e M), tradicionalmente utilizados em processos de purificação de IgG de diversas fontes, além deles apresentarem as desvantagens listadas acima em relação aos íons metálicos imobilizados, a proteína A adsorve IgG e em menor grau, IgM, sendo, ainda necessário uma etapa adicional para a remoção da IgM. A proteína A, ainda, apresenta a desvantagem de não adsorver a sub-classe IgG₃. (Loghem, 1982)

Todavia, apesar dos excelentes resultados de purificação encontrados utilizando-se PEVA-CM-Asp-Ni(II), testes adicionais analíticos em HPLC devem ser realizados a fim de se determinar a pureza das frações de eluição. Deve-se, além disso, realizar dosagem do íon níquel nas frações de eluição (por espectroscopia de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado) para verificar se houve desprendimento deste íon metálico durante a etapa de eluição.

4.1.7. Isotermas de adsorção

4.1.7.1. Determinação da capacidade máxima e da constante de dissociação

Os experimentos para a determinação das isotermas de adsorção de IgG para os adsorventes PEVA-IDA-Ni(II), PEVA-TREN-Ni(II) e PEVA-CM-Asp-Ni(II) foram realizados em frascos agitados, a 25°C, seguindo o procedimento descrito no item 3.2.5, visando determinar a capacidade máxima de adsorção (Q_m) e a constante de dissociação (K_d). As isotermas foram determinadas nas melhores condições tamponantes, ou seja, para os adsorventes PEVA-IDA-Ni(II) e PEVA-CM-Asp-Ni(II) os experimentos foram

realizados utilizando-se o tampão Tris-HCl 25 mM pH 7,0, enquanto para PEVA-TREN-Ni(II), utilizou-se o tampão MA 25 mM contendo NaCl 1 M pH 7,0.

Os resultados obtidos para a adsorção de IgG em PEVA-IDA-Ni(II), PEVA-TREN-Ni(II) e PEVA-CM-Asp-Ni(II) são apresentados na Figura 4.18, com os quais ajustaram-se os parâmetros do modelo de Langmüir (Equação 3.2) pelo método de regressão não-linear de Levenberg-Marquardt. Os valores de Q_m e K_d obtidos para este modelo estão apresentados na Tabela 4.15.

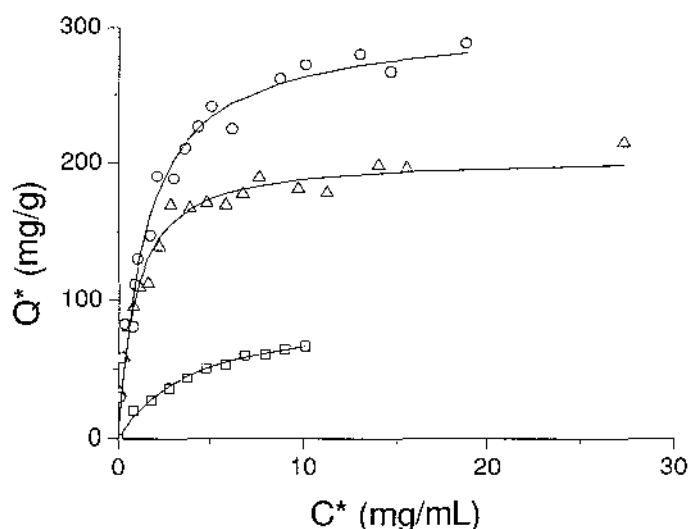


Figura 4.18: Isoterma de adsorção de IgG humana pré-purificada em membranas (Δ) PEVA-IDA-Ni(II), ($\square$) PEVA-TREN-Ni(II) e ($\circ$) PEVA-CM-Asp-Ni(II). Ajuste não linear dos parâmetros segundo modelo de Langmüir.

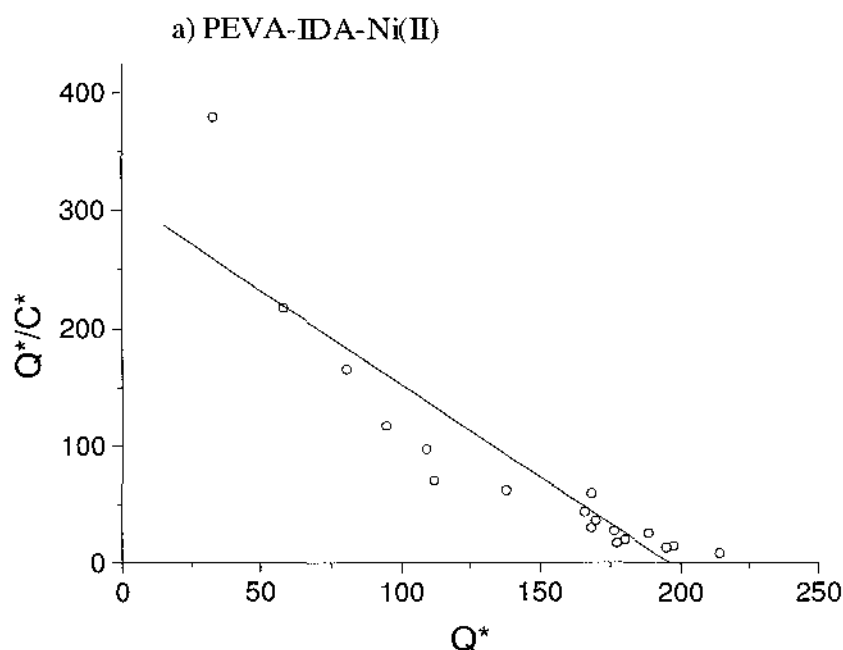
Tabela 4.15: Parâmetros obtidos a partir do ajuste não-linear do modelo de Langmüir aos dados de adsorção de IgG humana em membranas de PEVA-IDA-Ni(II), PEVA-TREN-Ni(II) e PEVA-CM-Asp-Ni(II).

Parâmetros	PEVA-IDA-Ni(II)	PEVA-TREN-Ni(II)	PEVA-CM-Asp-Ni(II)
Q_m (mg/g de membrana seca)	$204,57 \pm 4,62$	$93,91 \pm 2,90$	$302,27 \pm 9,26$
K_d (M)	$(6,13 \pm 0,7) \times 10^{-6}$	$(2,83 \pm 0,31) \times 10^{-5}$	$(1,01 \pm 0,12) \times 10^{-5}$
Coefficiente de correlação	0,975	0,992	0,975
Variância	95,85	3,62	215,82
Desvio padrão	9,79	1,90	14,69

Os valores de capacidade máxima (Q_m) obtidos para adsorção de IgG humana em PEVA-AQ-Ni(II) segue a seguinte ordem em relação aos agentes quelantes: CM-Asp > IDA > TREN. Para os ajustes realizados utilizando o PEVA-CM-Asp-Ni(II) e PEVA-IDA-Ni(II) em presença do tampão Tris-HCl, a capacidade de adsorção segue a mesma ordem encontrada para adsorção de IgG pré-purificada em modo dinâmico (item 4.1.3). Para PEVA-TREN-Ni(II), o valor de Q_m encontrado foi inferior ao encontrado para os outros adsorventes estudados neste item.

Em relação à constante de dissociação (K_d), os valores encontrados seguem a seguinte ordem em relação aos agentes quelantes estudados TREN > CM-Asp > IDA, ou seja, a afinidade entre o suporte e a IgG é maior para PEVA-IDA-Ni(II), seguido de PEVA-CM-Asp-Ni(II) e PEVA-TREN-Ni(II).

Os valores dos coeficientes de correlação do ajuste foram de 0,975, 0,992 e 0,975 para PEVA-IDA-Ni(II), PEVA-TREN-Ni(II) e PEVA-CM-Asp-Ni(II), respectivamente (valores próximos a 1,0). Para avaliar a validade do ajuste do modelo de Langmüir, foi realizado a linearização do modelo segundo a equação de Scatchard (equação 3.3), onde a forma do gráfico Q^*/C^* em função de Q^* é sensível para indicar a existência de interações cooperativas na adsorção das proteínas no ligante imobilizado (Figura 4.19).



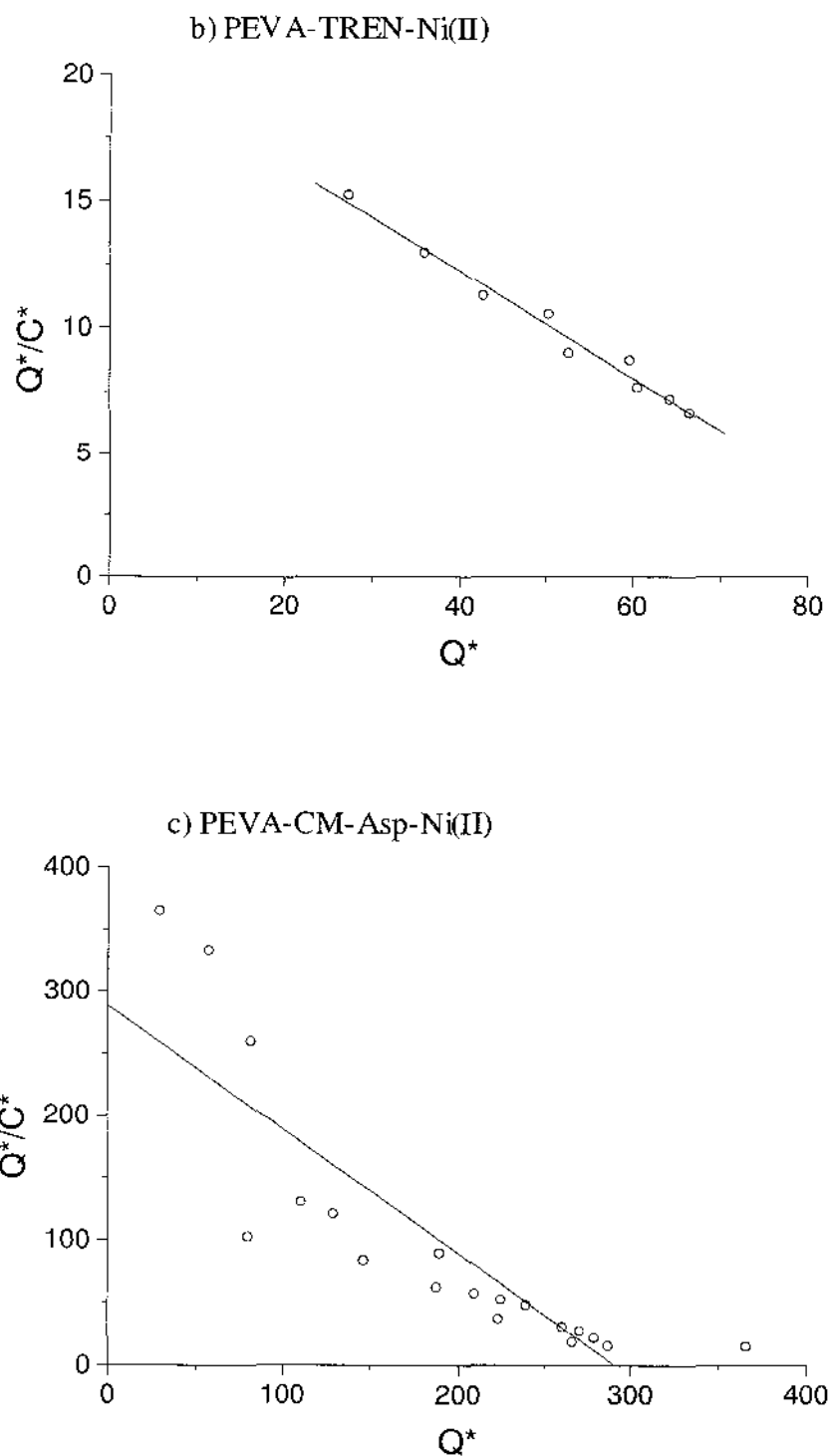


Figura 4.19: Gráfico de Scatchard para os dados de adsorção de IgG humana pré-purificada em membranas a) PEVA-IDA-Ni(II), $R^2 = 0,81$; b) PEVA-TREN-Ni(II), $R^2 = 0,99$ e c) PEVA-CM-Asp-Ni(II), $R^2 = 0,86$.

A análise do gráfico de Scatchard mostra que os dados referentes à adsorção de IgG às membranas de PEVA-TREN-Ni(II), apresentou comportamento linear indicando a validade do modelo de Langmüir e natureza homogênea das interações entre matriz e proteína. O modelo de Langmüir é simplificado e assume as seguintes hipóteses: a adsorção é reversível e limitada a uma camada, a superfície interna do sólido é homogênea e apresenta um número finito de sítios ativos, as moléculas adsorvidas não interagem entre si e não há adsorção competitiva.

Para a adsorção de IgG humana em PEVA-IDA-Ni(II) e PEVA-CM-Asp-Ni(II), o gráfico de Scatchard não apresentou um comportamento linear, indicando a existência de desvios do modelo de Langmüir. Estes desvios podem estar relacionados à existência de interações de cooperatividade, originadas devido à natureza macromolecular da proteína e da existência de múltiplas interações entre a matriz e os múltiplos grupos funcionais da biomolécula. Como visto anteriormente, as interações entre a IgG e a matriz, apresentam, possivelmente, contribuições de interações eletrostáticas na utilização do tampão Tris-HCl em ausência de NaCl, além das interações de coordenação entre o íon metálico e a proteína. Além disso, contribuições hidrofóbicas entre proteína-proteína e proteína matriz podem ainda participar na retenção da IgG no adsorvente. Existe ainda a possibilidade das IgGs (devido ao tamanho e efeito estérico) estarem se ligando à matriz por meio de interações multipontos (forte retenção da IgG) onde mais de um íon metálico participa da retenção da mesma proteína, ou, um único íon metálico participa da retenção de uma única IgG (diminuindo a força de retenção da IgG ao adsorvente). Todos esses fatores contribuem para o desvio do modelo de Langmüir.

Aplicou-se, então, para adsorção de IgG humana em PEVA-IDA-Ni(II) e PEVA-CM-Asp-Ni(II), o modelo de Langmüir-Freundlich (Eq. 3.4). Esse modelo leva em consideração a existência de heterogeneidade das interações entre a proteína e o adsorvente. A Figura 4.20 apresenta os ajustes das curvas segundo o modelo de Langmüir-Freundlich, enquanto os parâmetros do modelo, ajustados segundo método não-linear de Levenberg-Marquardt, estão apresentados na Tabela 4.16.

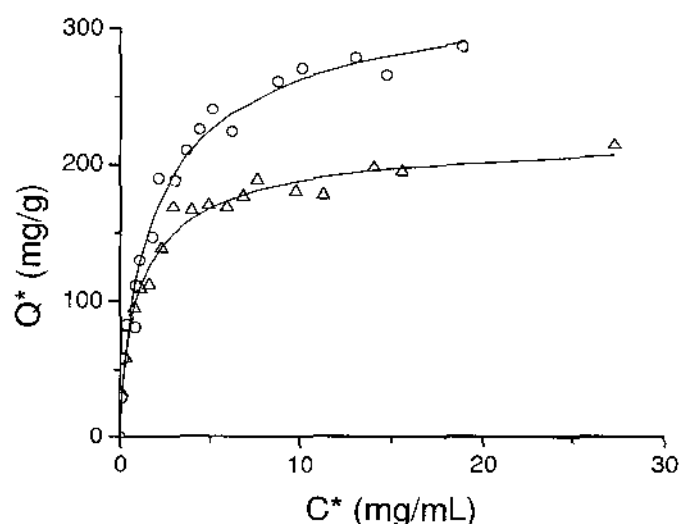


Figura 4.20: Isoterma de adsorção de IgG humana em (Δ) PEVA-IDA-Ni(II) e ($\circ$) PEVA-CM-Asp-Ni(II) com ajuste não linear dos parâmetros segundo modelo de Langmüir-Freundlich.

Tabela 4.16: Parâmetros obtidos a partir do ajuste não linear do modelo de Langmüir-Freundlich aos dados de adsorção de IgG humana em membranas de PEVA-IDA-Ni(II) e PEVA-CM-Asp-Ni(II).

Parâmetros	PEVA-IDA-Ni(II)	PEVA-CM-Asp-Ni(II)
$Q_{\max}$ (mg/g seca de membrana)	$224,30 \pm 15,34$	$349,80 \pm 30,62$
$Kd_{(LF)}$ (M)	$(7,20 \pm 0,21) \times 10^{-6}$	$(1,21 \pm 0,18) \times 10^{-5}$
n	$0,73 \pm 0,09$	$0,74 \pm 0,09$
Cocficiente de correlação	0,984	0,983
Variância	65,84	162,80
Desvio padrão	8,11	12,76

O ajuste não-linear, segundo o modelo de Langmüir-Freundlich, apresentou valor de n menor que 1 para PEVA-IDA-Ni(II) e PEVA-CM-Asp-Ni(II), o que indica uma cooperatividade negativa, ou seja, a adsorção de uma molécula de IgG desfavorece a adsorção de outra molécula do anticorpo.

Os valores de K_d e K_{dLF} obtidos com ajuste não-linear dos modelos de Langmüir e Langmüir-Freundlich para a adsorção de IgG em PEVA-IDA-Ni(II), PEVA-CM-Asp-Ni(II) e PEVA-TREN-Ni(II), são valores típicos de constantes de dissociação que caracterizam sistemas de pseudobioafinidade, onde os valores estão na faixa de 10^{-2} a 10^{-7} M. Os valores de Q_m obtidos segundo o ajuste dos modelos de Langmüir e Langmüir-Freundlich evidenciam alta capacidade de adsorção de IgG em PEVA-IDA-Ni(II) e PEVA-CM-Asp-Ni(II). Serpa *et al*, 2005 obteve valores de Q_m igual a 63,4 mg/g seca para adsorção de IgG₁ de camundongo em PEVA-IDA-Zn(II), valores inferiores ao encontrado neste trabalho. Segundo Sulkowski, 1989, o íon metálico níquel proporciona maior capacidade de adsorção que o zinco, sendo provavelmente um dos motivos do maior valor de Q_m encontrado no presente trabalho. Cabe ressaltar que a fonte das imunoglobulinas não é a mesma (IgG de camundongo, no caso do trabalho de Serpa *et al*, 2005 e IgG humana, neste presente trabalho).

4.1.7.2. Determinação de parâmetros termodinâmicos

A fim de estudar os parâmetros termodinâmicos do sistema PEVA-IDA-Ni(II), (escolheu-se este sistema pelo fato do IDA ser um agente quelante tradicionalmente usado em IMAC) realizou-se isotermas de adsorção às temperaturas constantes de 4°C, 15°C, 25°C e 37°C (seguindo protocolo apresentado no item 3.2.5). Utilizou-se, nesta etapa, os tampões de adsorção Tris-HCl 25 mM pH 7,0 e Tris-HCl 25 mM contendo 1 M NaCl a pH 7,0 para estudos de interações eletrostáticas e hidrofóbicas. Os tampões acrescidos de sal NaCl, de alta força iônica, desfavorecem as interações eletrostáticas, porém favorecem as interações hidrofóbicas. O ajuste não-linear das isotermas ao modelo de Langmüir estão apresentados nas Figuras 4.21 e Tabelas 4.17 e 4.18.

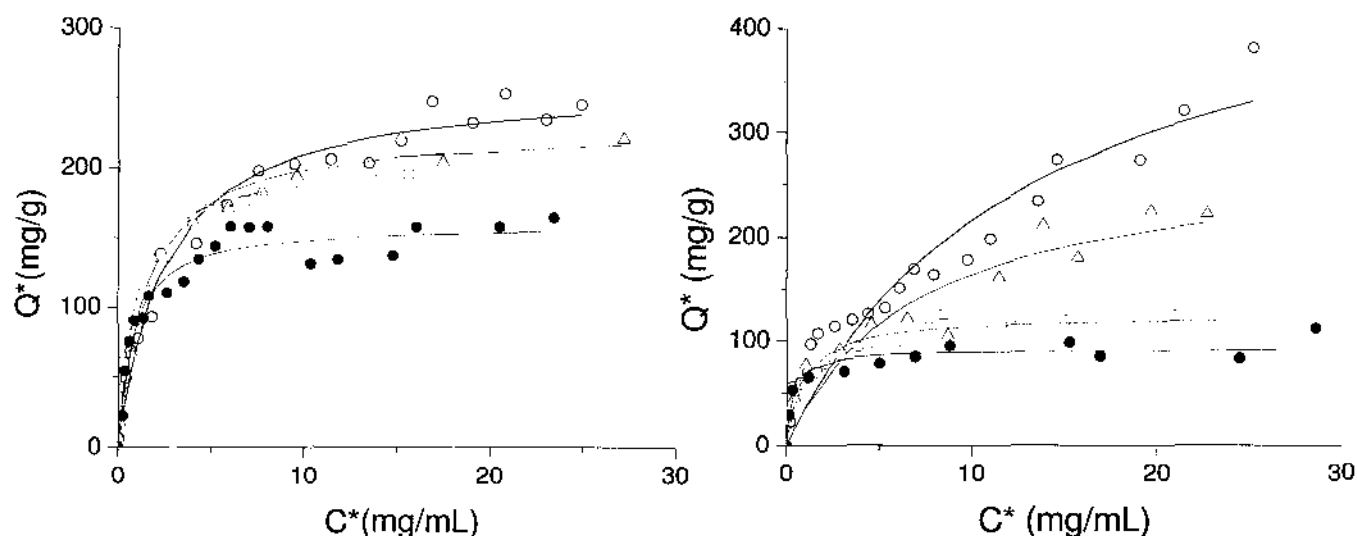


Figura 4.21: Isoterma de adsorção de IgG humana pré-purificada em membranas PEVA-IDA-Ni(II) em presença do tampão de adsorção a) Tris-HCl 25 mM pH 7,0 e b) Tris-HCl 25 mM , NaCl 1 M pH 7,0 a diferentes temperaturas: (○) 4°C, (Δ) 15°C (□) 25°C e (●) 37°C. Ajuste não linear dos parâmetros segundo modelo de Langmüir.

Tabela 4.17: Parâmetros obtidos a partir do ajuste não-linear do modelo de Langmüir aos dados de adsorção de IgG humana em membranas PEVA-IDA-Ni(II) utilizando-se o tampão de adsorção Tris-HCl 25 mM pH 7,0

Parâmetros	4°C	15 °C	25 °C	37 °C
Q_m (mg/g de membrana seca)	$262,7 \pm 8,6$	$228,0 \pm 7,2$	$204,6 \pm 4,6$	$159,4 \pm 4,6$
K_d (M)	$(1,7 \pm 0,2) \times 10^{-5}$	$(9,9 \pm 1,3) \times 10^{-6}$	$(6,1 \pm 0,7) \times 10^{-6}$	$(5,3 \pm 0,8) \times 10^{-6}$
Coefficiente de correlação	0,976	0,978	0,975	0,948
Variância	206,30	153,71	95,85	121,67
Desvio padrão	14,36	12,40	9,79	11,03

Tabela 4.18: Parâmetros obtidos a partir do ajuste não-linear do modelo de Langmüir aos dados de adsorção de IgG humana em membranas PEVA-IDA-Ni(II) utilizando-se o tampão de adsorção Tris-HCl 25 mM contendo 1 M de NaCl a pH 7,0

Parâmetros	4°C	15 °C	25 °C	37 °C
Q_m (mg/g de membrana seca)	$505,0 \pm 72,5$	$279,3 \pm 43,6$	$124,2 \pm 4,8$	$92,2 \pm 4,0$
K_d (M)	$(8,9 \pm 0,2) \times 10^{-5}$	$(4,7 \pm 0,2) \times 10^{-5}$	$(6,3 \pm 1,2) \times 10^{-6}$	$(2,2 \pm 0,7) \times 10^{-6}$
Coefficiente de correlação	0,908	0,892	0,923	0,912
Variância	934,01	654,1	103,08	94,35
Desvio padrão	30,56	25,58	10,15	9,71

Os parâmetros termodinâmicos de adsorção foram determinados de acordo com procedimento apresentado na seção 3.2.6, como descrito por Haupt *et al*, 1995 e estão apresentados na Tabela 4.19. A Figura 4.22 apresenta o gráfico de Van't Hoff ($\ln(K_d)$) em função de $1/T$), onde o coeficiente angular da reta fornece os valores de ΔH° , segundo Equação 3.9.

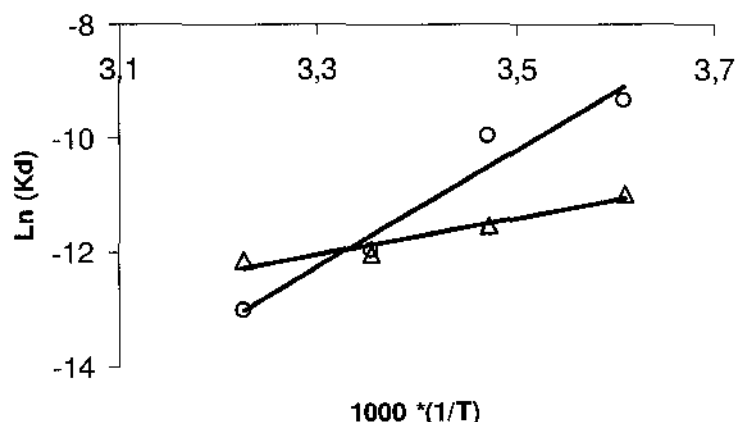


Figura 4.22: Gráfico de Van't Hoff ($\ln(K_d)$) em função de $1/T$) para a adsorção de IgG em presença dos tampões : (Δ) Tris-HCl 25 mM pH 7,0 e (○) Tris-HCl 25 mM, 1 M NaCl pH 7,0

Tabela 4.19: Parâmetros termodinâmicos para a adsorção de IgG em PEVA-IDA-Ni(II) em presença do tampão Tris-HCl 25 mM pH 7,0 contendo 0 M e 1 M de NaCl.

Tampão	Temperatura	ΔG° (kJ/ mol)	ΔH° (kJ/ mol)	ΔS° (J/ mol)
Tris-HCl 25 mM 0 M NaCl	4 °C	-24,7	+ 26,2	183,8
	15 °C	-27,0		184,6
	25 °C	-29,1		185,6
	37 °C	-30,6		183,2
Tris-HCl 25 mM 1 M NaCl	4 °C	-21,0	+ 85,1	383,1
	15 °C	-23,4		376,6
	25 °C	-29,0		383,0
	37 °C	-32,8		380,4

Os valores de ΔG° foram calculados para ambos os sistemas contendo 0 M e 1 M de NaCl, em todas as temperaturas (Tabela 4.19). Os valores ΔG° foram negativos em todos os casos, indicando o processo favorável da adsorção. Os valores de ΔG° obtidos nestes experimentos variaram de - 21,0 a -32,8 kJ/mol. Esses valores são de magnitude similares aos valores encontrados por Finette *et al*, 1997 para sílica-IDA-Cu(II) utilizando a proteína albumina do soro humano (-28,3 a -29,4 kJ/mol). Já os valores de ΔS° encontrados são positivos em todos os casos, indicando um aumento na desordem total do sistema durante a adsorção. Segundo He *et al*, 2006, do ponto de vista da estrutura da água, valores de ΔS° e ΔH° positivo são freqüentemente vistos como evidência de interações hidrofóbicas. Ainda, interações eletrostáticas entre espécies iônicas em solução aquosa são caracterizadas por valores de ΔS° positivos e ΔH° negativo, enquanto ΔS° e ΔH° negativos são característicos de ligações de hidrogênio. Os valores de ΔH° encontrados foram positivos (26,2 e 85,1 kJ/mol para os sistemas contendo 0 M e 1 M de NaCl, respectivamente), indicando, neste caso, a contribuição de interações hidrofóbicas em ambos sistemas.

O abaixamento da temperatura favorece as ligações entre a proteína e o íon metálico imobilizado e também as interações eletrostáticas (Finette *et al*, 1997). Normalmente

observa-se um aumento no valor de K_d com o aumento da temperatura nos processos envolvendo ligações de coordenação e/ou interações eletrostáticas. O oposto foi observado na adsorção de IgG em PEVA-IDA-Ni(II) em presença de ambos tampões testados (Tris-HCl contendo 0 e 1 M de NaCl).

Apesar dos resultados dos parâmetros termodinâmicos indicarem que as interações hidrofóbicas são importantes na adsorção, interações eletrostáticas bem como as ligações de coordenação (supostamente a principal ligação entre proteína e matriz nos processos envolvendo IMAC) não são excluídas. Normalmente, as interações hidrofóbicas são as únicas interações que aumentam com o aumento da temperatura (Haupt *et al*, 1995). Espera-se, portanto, que nos processos envolvendo estas interações como a principal contribuição na adsorção de proteínas, que a afinidade e a capacidade aumentem com a temperatura (Finette *et al*, 1997). Em relação à afinidade, observou-se nos resultados apresentados, que a constante de dissociação (K_d) diminui com o aumento da temperatura, fornecendo, desta forma, valores de ΔH° positivos, demonstrando a existência das contribuições hidrofóbicas. Porém, os resultados para Q_m , tanto na utilização de NaCl, como para aquele em ausência de NaCl, diminuíram com o aumento da temperatura. Observa-se, ainda (Tabelas 4.17 e 4.18), que a baixas temperaturas (4 e 15 °C), a presença de 1 M de NaCl no tampão proporcionou maiores valores de Q_m que em ausência de NaCl. Uma primeira hipótese para este comportamento está na possibilidade do sal NaCl no tampão Tris-HCl favorecer uma maior ocorrência de ligações de coordenação ou favorecer ainda o surgimento de uma adsorção multicamada nessas temperaturas. Porém, em temperaturas mais elevadas (25 e 37°C), a utilização de NaCl proporcionou diminuição nos valores de Q_m , indicando, que a temperaturas mais elevadas, a utilização do tampão Tris-HCl em ausência de NaCl parece favorecer a contribuição de interações eletrostáticas.

Uma explicação possível dos resultados apresentados pode estar na natureza heterogênea da adsorção. A análise dos gráficos de Scatchard (Anexo K) mostrou o desvio do comportamento de Langmuir para todos os casos, indicando a heterogeneidade da matriz e das interações entre proteína – adsorvente e proteína – proteína. Nota-se que em menores temperaturas, há um maior desvio do comportamento de Langmuir. As IgGs (devido ao tamanho e efeito estérico) podem estar se ligando à matriz em interações multipontos (forte retenção da IgG), ou, em um único íon metálico (diminuindo a força de retenção da IgG ao

adsorvente) (Figura 4.23) ou ainda interações proteína-proteína podem tomar lugar (Gaberc-Porekar e Menart, 2001 e Johnson e Arnold, 1995). Em baixas temperaturas, há o favorecimento das ligações de coordenação (Finette *et al.*, 1997) e, conseqüentemente, pode haver o favorecimento da adsorção de IgG, em relação às temperaturas mais altas, de ligações variadas multipontos ou em um único ponto (força de retenção mais baixa). Um maior número de IgG adsorvida a matriz, em relação à temperaturas mais altas, parece favorecer o aparecimento de uma segunda camada de adsorção da IgG (adsorção multicamada). As Figuras 4.24 e 4.25 apresentam os dados experimentais e as curvas ajustadas usando os modelos de Langmüir-Freundlich e Multicamada de Langmüir e as Tabelas 4.20 e 4.21 apresentam os parâmetros ajustados para os modelos. Os dados não convergiram para o ajuste ao modelo de Langmüir-Freundlich para os experimentos realizados em presença de Tris-HCl 25 mM contendo NaCl nas temperaturas de 4 e 15 °C. O ajuste dos dados ao modelo Multicamada de Langmüir mostra uma maior afinidade entre proteína – proteína (K_{dd}) em menores temperaturas. Os resultados apontaram ainda, que o modelo multicamada se ajustou bem aos dados referentes a 4°C e 15°C em presença de NaCl, indicando que a adição de NaCl nessas temperaturas pode ajudar na formação da multicamada. Possivelmente, essa outra camada de IgG adsorvida, é governada por interações hidrofóbicas (interação proteína-proteína).

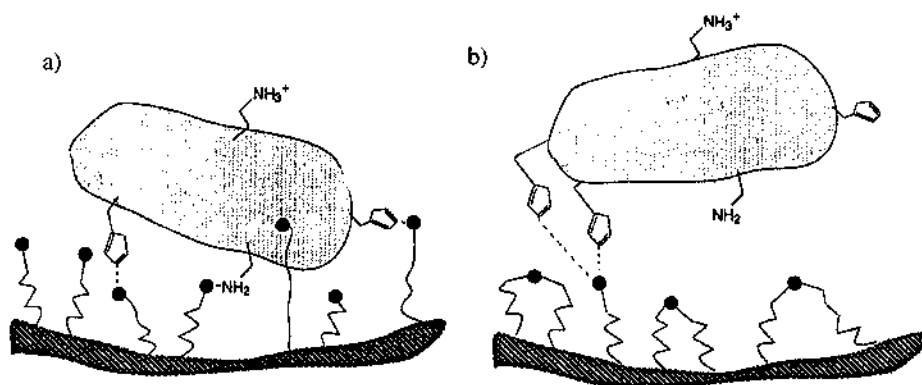


Figura 4.23: Interações propostas em IMAC a) interações multipontos, b) interações em um único ponto (adaptado de Gaberc-Porekar e Menart, 2001) .

Com o aumento da temperatura, as ligações de coordenação são desfavorecidas, provavelmente as ligações de IgGs de menor força de retenção são também desfavorecidas, permanecendo preferencialmente ligada à matriz as IgGs com maior força de retenção (uma

IgG por sítio de adsorção) com maior afinidade pela matriz (observa-se um comportamento mais próximo ao de Langmüir com o aumento da temperatura). Desta maneira, diminui-se também a capacidade do adsorvente, diminuindo a quantidade de IgG adsorvida em monocamada e, conseqüentemente, desfavorecendo o aparecimento da segunda camada de adsorção (em maiores temperaturas K_{dd} diminui) e desta forma diminuindo a capacidade para a adsorção de IgG.

Conclui-se que os resultados dos parâmetros termodinâmicos indicaram a prevalência de interações hidrofóbicas no sistema, porém devido à heterogeneidade da matriz e das ligações proteína – proteína e proteína – matriz, as interações eletrostáticas e ligações de coordenação não são excluídas. Em baixas temperaturas há maior adsorção de IgG e, conseqüentemente, o aparecimento de multicamadas devido à interações hidrofóbicas predominantes nas interações proteína-proteína, interações essas favorecidas pelo acréscimo de NaCl. Com o aumento da temperatura, o perfil das isotermas se aproxima do comportamento Langmuiriano, há o desfavorecimento do aparecimento da multicamada devido às menores quantidades de IgG adsorvidas em monocamada e, conseqüentemente, as contribuições hidrofóbicas devido às interação proteína – proteína são minimizadas.

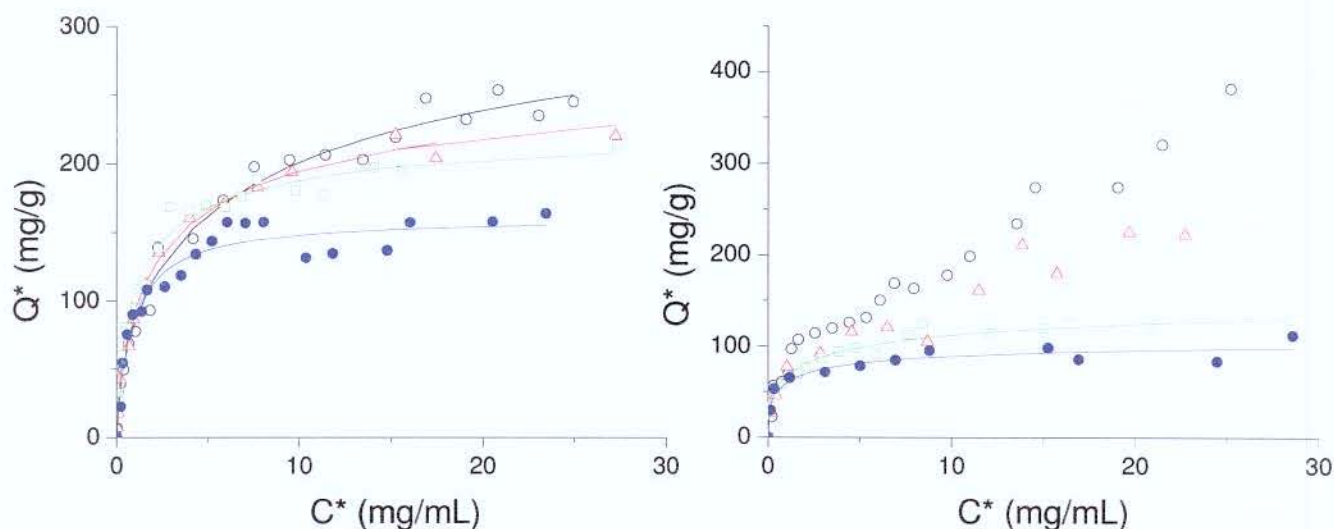


Figura 4.24: Isoterma de adsorção de IgG humana pré-purificada em membranas PEVA-IDA-Ni(II) em presença do tampão de adsorção a) Tris-HCl 25 mM pH 7,0 e b) Tris-HCl 25 mM , NaCl 1 M pH 7,0 a diferentes temperaturas: (○) 4°C, (△) 15°C (□) 25°C e (●) 37°C. Ajuste não-linear dos parâmetros segundo modelo de Langmüir-Freundlich.

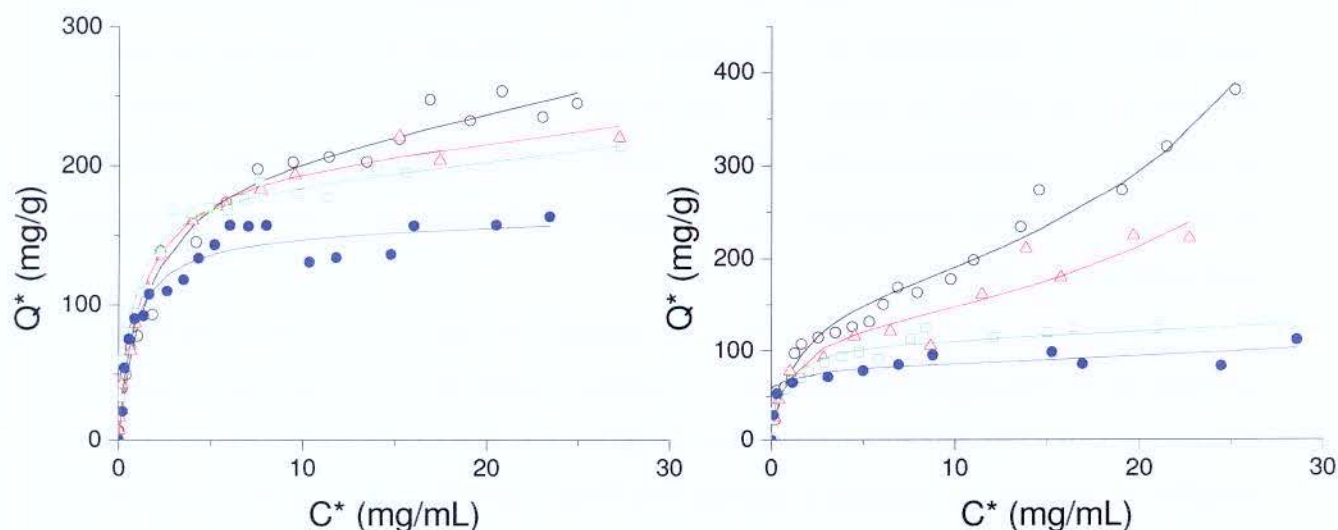


Figura 4.25: Isoterma de adsorção de IgG humana pré-purificada em membranas PEVA-IDA-Ni(II) em presença do tampão de adsorção a) Tris-HCl 25 mM pH 7,0 e b) Tris-HCl 25 mM , NaCl 1 M pH 7,0 a diferentes temperaturas: (○) 4°C, (Δ) 15°C (□) 25°C e (●) 37°C. Ajuste não linear dos parâmetros segundo modelo de Multicamada de Langmüir.

Tabela 4.20: Parâmetros obtidos a partir do ajuste linear do modelo de Langmüir-Freundlich aos dados de adsorção de IgG humana em membranas de PEVA-IDA-Ni(II) utilizando-se o tampão Tris-HCl 25 mM em presença de 1 M e 0 M de NaCl

		$Q_{\max}$ (mg/g seca de membrana)	Kd	n	Coefficiente de correlação	Variância	Desvio padrão
1 M NaCl	4 °C	-	-	-	-	-	-
	15 °C	-	-	-	-	-	-
	25 °C	$173,9 \pm 30,8$	$(1,1 \pm 0,3) \times 10^{-5}$	$0,46 \pm 0,10$	0,97	42,42	6,51
	37 °C	$117,3 \pm 28,3$	$(6,2 \pm 3,7) \times 10^{-6}$	$0,46 \pm 0,20$	0,93	71,13	8,43
Zero M NaCl	4 °C	$378,7 \pm 60,1$	$(2,3 \pm 0,5) \times 10^{-5}$	$0,59 \pm 0,07$	0,99	108,52	10,42
	15 °C	$282,7 \pm 23,7$	$(1,3 \pm 0,2) \times 10^{-5}$	$0,64 \pm 0,07$	0,99	70,27	8,38
	25 °C	$224,3 \pm 15,0$	$(7,2 \pm 0,2) \times 10^{-6}$	$0,73 \pm 0,09$	0,98	65,84	8,11
	37 °C	$161,5 \pm 9,0$	$(6,3 \pm 1,2) \times 10^{-6}$	$0,82 \pm 0,20$	0,95	128,17	11,32

Tabela 4.21: Parâmetros obtidos a partir do ajuste linear do modelo de multicamada de Langmüir aos dados de adsorção de IgG humana em membranas de PEVA-IDA-Ni(II) utilizando-se o tampão Tris-HCl 25 mM em presença de 1 M e Zero M de NaCl.

		$Q_{\max}$ (mg/g seca de membrana)	Kd	Kdd	Coefficiente de correlação	Variância	Desvio padrão
1 M NaCl	4 °C	160,0 ± 9,1	$(9,1 \pm 2,1) \times 10^{-6}$	$(2,8 \pm 0,1) \times 10^{-4}$	0,98	251,0	15,8
	15 °C	123,1 ± 15,3	$(8,3 \pm 4,6) \times 10^{-6}$	$(3,1 \pm 0,5) \times 10^{-4}$	0,93	428,1	20,7
	25 °C	110,1 ± 8,7	$(4,6 \pm 1,4) \times 10^{-6}$	$(1,7 \pm 1,0) \times 10^{-3}$	0,89	103,3	10,2
	37 °C	117,3 ± 28,3	$(1,7 \pm 0,6) \times 10^{-6}$	$(1,0 \pm 0,4) \times 10^{-3}$	0,88	75,7	8,7
Zero M NaCl	4 °C	211,1 ± 17,2	$(1,1 \pm 0,3) \times 10^{-5}$	$(9,4 \pm 3,4) \times 10^{-4}$	0,98	182,1	13,5
	15 °C	203,8 ± 14,8	$(8,0 \pm 1,7) \times 10^{-6}$	$(2,1 \pm 1,3) \times 10^{-3}$	0,98	153,6	12,4
	25 °C	185,5 ± 7,5	$(4,7 \pm 0,7) \times 10^{-6}$	$(1,4 \pm 0,5) \times 10^{-3}$	0,97	89,9	9,5
	37 °C	154,6 ± 10,9	$(5,1 \pm 1,2) \times 10^{-6}$	$(1,0 \pm 2,2) \times 10^{-3}$	0,92	135,1	11,6

4.2. UTILIZAÇÃO DO AGENTE QUELANTE CM-Asp COMO LIGANTE PARA A PURIFICAÇÃO DE IgG A PARTIR DO PLASMA HUMANO

Os agentes quelantes IDA, TREN e CM-Asp quando imobilizados apresentam carga elétrica em pHs neutros como demonstrado no item 4.1.3 3 4.1.4 Como verificado anteriormente, o TREN apresenta carga líquida positiva, enquanto o CM-Asp e o IDA apresentam carga líquida negativa em pHs neutros. A partir dos resultados apresentados no item 4.1.3 e 4.1.4, verificou-se a influência das interações eletrostáticas na adsorção de proteínas na utilização de tampões em ausência de NaCl devido à carga líquida apresentada pelos adsorventes. Verificou-se que, em presença de tampão em ausência de NaCl, o adsorvente PEVA-TREN-Ni(II), carga líquida positiva em pH 7,0, adsorveu grandes quantidades de proteínas de carga líquida negativa (albumina principalmente de pI 4,9),

enquanto PEVA-IDA-Ni(II) e PEVA-CM-Asp-Ni(II) adsorveram preferencialmente IgG ($6,3 > pI > 9,0$). O adsorvente PEVA-CM-Asp-Ni(II) apresentou ainda maior capacidade para adsorver IgG que o PEVA-IDA-Ni(II) em presença do tampão de Tris-HCl em ausência de NaCl, indicando que as contribuições das interações eletrostáticas são maiores na utilização do agente quelante CM-Asp. Esse resultado é esperado já que o CM-Asp apresenta três grupamento carboxílico de pKs abaixo de 4,0 enquanto o IDA apresenta apenas dois.

Desta forma, explorando as características de carga do CM-Asp, avaliou-se a utilização deste agente quelante imobilizado a membranas de PEVA não quelatado a metal com a finalidade de purificar IgG a partir do plasma humano. Nestes experimentos cromatográficos não foram efetuadas as etapas de carregamento da coluna com sulfato de metal. Os tampões de adsorção testados foram o Tris-HCl 25 mM, Mops 25 mM e Mes 25 mM em diferentes pHs. Foi injetado a coluna plasma humano diluído 1:5 em tampão de adsorção (8,5 mL) contendo quantidades próximas a 110 mg de proteínas totais, 5,5 a 6,0 mg de IgA, 19 a 20 mg de IgG, 1,5 a 2,5 de IgM, 57 a 60 mg de albumina, 3,5 a 4,0 mg de transferrina. A eluição foi realizada pela adição de 1 M de NaCl, enquanto a regeneração foi feita com solução de NaOH 20 mM. O resumo dos experimentos realizados é mostrado na Figura 4.26, apresentando as quantidades das proteínas IgA, IgG, IgM e transferrina medidas nas etapas de eluição. A albumina não foi detectada por nefelometria nas frações de eluição de nenhum dos experimentos realizados.

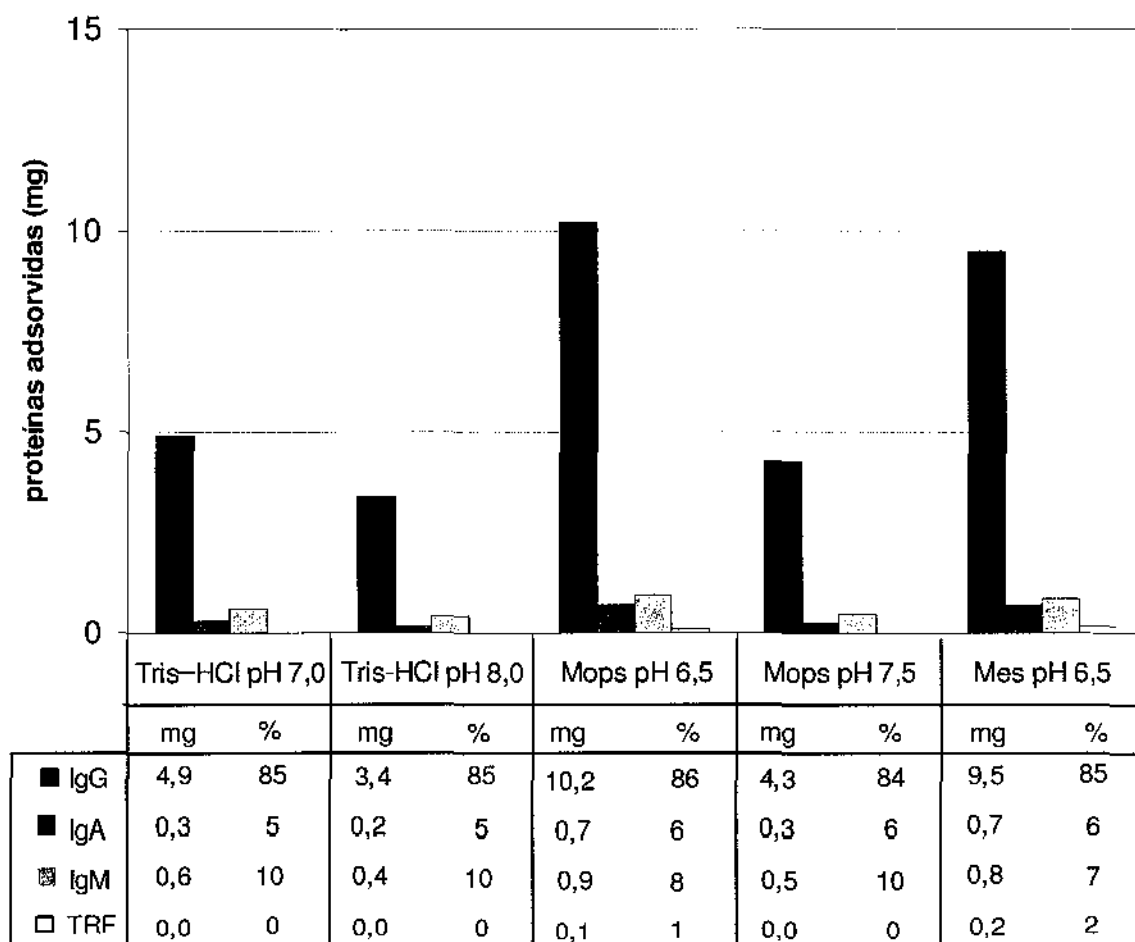


Figura 4.26: Total de proteínas adsorvidas em PEVA-CM-Asp finamente cortadas. Volume do leito: 5 mL. Injeção de 8,5 mL de solução de plasma diluído 1:5 em tampão de adsorção. Vazão: 0,5 mL/min. Eluição por adição de 1 M de NaCl ao tampão de adsorção. Dosagem por nefelometria de: IgA, IgG e IgM, TRF (transferrina)

A partir dos resultados apresentados, nota-se que houve adsorção de IgA ($3,9 > pI > 6,1$, Lijima *et al*, 1999), IgM ($3,9 > pI > 6,1$, Lijima *et al*, 1999) e IgG em todos os experimentos. A eluição por adição de NaCl sugere que as interações eletrostáticas predominam. A transferrina ($pI = 5,5$, Putnam *et al*, 1975) foi adsorvida em pequenas quantidades apenas nos experimentos realizados utilizando-se tampões de pH 6,5. Nota-se que as quantidades de IgG, IgA e IgM adsorvidas aumentam com o decréscimo do pH. A utilização do tampão Tris-HCl não proporcionou alta adsorção de IgG, provavelmente devido aos valores de pHs utilizados, pH 7,0 e 8,0 (faixa tamponante do Tris-HCl: pH de 7,0 a 9,0). As maiores quantidades de IgG adsorvidas foram obtidas para Mops e Mes 25

mM, ambos a pH 6,5. As Figuras 4.27 e 4.28 e as Tabelas 4.22 e 4.23 apresentam o cromatograma e eletroforese SDS-PAGE, assim como o balanço de massa para as proteínas estudadas.

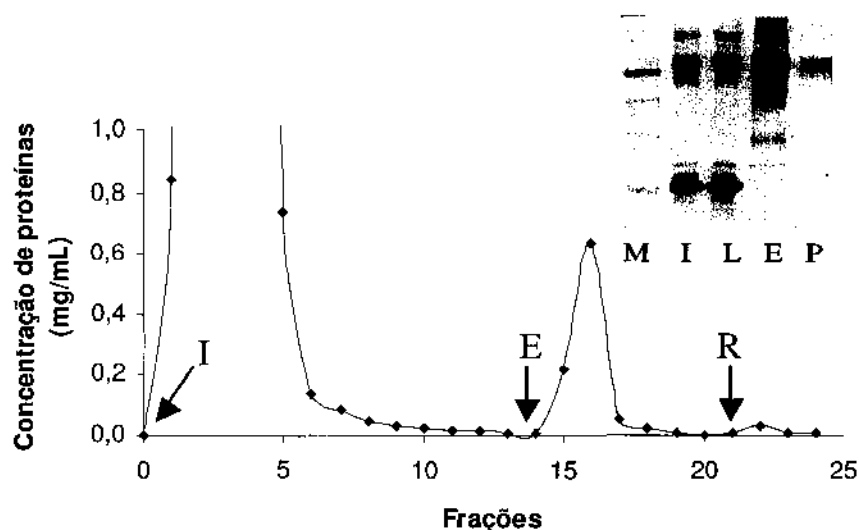


Figura 4.27: Cromatografia de plasma diluído 1: 5 em tampão de adsorção Mops 25 mM a pH 6,5. M- marcador de alta massa molecular; I- injeção; L- lavagem; E- eluição por adição de 1 M NaCl ao tampão de adsorção; R- regeneração: NaOH 20 mM; P- IgG de alta pureza Aventis.

Tabela 4.22: Balanço de massa para IgG, IgA, IgM, transferrina e albumina humana. Tampão de adsorção: Mops 25 mM, pH 6,5. Eluição: Mops 25 mM, pH 6,5, 1 M NaCl

		PT ¹	IgA ²	IgG ³	IgM ⁴	AH ⁵	TRF ⁶	IgG/ PT (mg/mg)	Fator de purificação
Injeção	(mg)	106,7	5,4	18,9	1,7	57,5	3,5	0,18	1,00
	(%)	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0		
Lavagem	(mg)	105,8	4,9	11,2	0,9	56,6	3,4	0,11	0,59
	(%)	99,2	90,3	59,4	54,5	98,6	94,4		
Eluição	(mg)	11,9	0,7	10,2	0,9	bt ⁷	0,1	0,86	4,76
	(%)	11,2	12,7	54,0	54,4	0,0	2,9		
Recuperação	(mg)	117,7	5,6	21,4	1,9	56,6	3,5	-	-
	(%)	110,3	103,0	113,4	108,9	98,6	97,3		

¹ PT, Proteína Total, dosagem pelo método de Bradford, 1975, ² IgA, imunoglobulina A, dosagem por nefelometria, ³ IgG, imunoglobulina G, dosagem por nefelometria, ⁴ Imunoglobulina M, dosagem por nefelometria, ⁵ AH, albumina humana, dosagem por nefelometria, ⁶ TRF, transferrina, dosagem por nefelometria, ⁷ bt, abaixo do limite detectável.

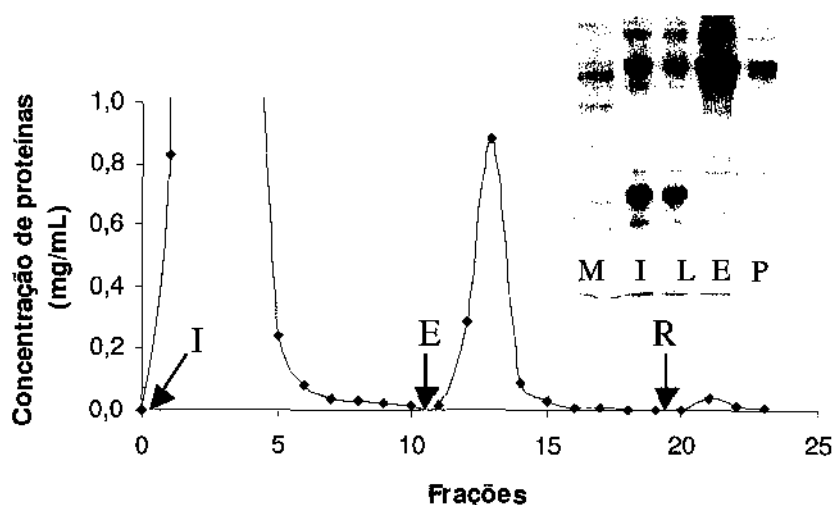


Figura 4.28: Cromatografia de plasma diluído 1: 5 em PEVA-CM-Asp. Tampão de adsorção Mes 25 mM pH 6,5; M- marcador de alta massa molecular; I: injeção; L: lavagem; E: eluição por adição de NaCl 1 M ao tampão de adsorção; R: regeneração, NaOH 20 mM; P: IgG de alta pureza Aventis.

Tabela 4.23: Balanço de massa para proteína total, IgG, IgA, IgM, transferrina e albumina humana. Tampão de adsorção: Mes 25 mM, pH 6,5. Eluição: Mes 25 mM, pH 6,5, 1 M NaCl

		PT ¹	IgA ²	IgG ³	IgM ⁴	AH ⁵	TRF ⁶	IgG/ PT (mg/mg)	Fator de purificação
Injeção	(mg)	106,3	5,9	20,5	2,1	57,8	3,6	0,19	1
	(%)	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0		
Lavagem	(mg)	101,6	5,3	13,2	1,0	62,1	3,6	0,13	0,68
	(%)	95,6	90,5	64,4	47,9	107,4	98,8		
Eluição	(mg)	11,2	0,7	9,5	0,9	bt ⁷	0,2	0,85	4,46
	(%)	10,5	11,4	46,3	41,1	0,0	4,6		
Recuperação	(mg)	112,8	6,0	22,7	1,8	62,1	3,8	-	-
	(%)	106,1	101,9	110,7	89,0	107,4	103,4		

¹ PT, Proteína Total, dosagem pelo método de Bradford, 1975, ² IgA, imunoglobulina A, dosagem por nefelometria, ³ IgG, imunoglobulina G, dosagem por nefelometria, ⁴ Imunoglobulina M, dosagem por nefelometria, ⁵ AH, albumina humana, dosagem por nefelometria, ⁶ TRF, transferrina, dosagem por nefelometria, ⁷bt, abaixo do limite detectável.

Os anexos I e J apresentam os cromatogramas, bem como o balanço de massa para todas as proteínas medidas e eletroforeses dos demais experimentos. Os resultados apresentados indicam a adsorção de 9,5-10,2 mg de IgG (46-54% do total injetado), quantidades equivalentes à apresentada por PEVA-CM-Asp-Ni(II) (membranas finamente cortadas) em presença de Tris-HCl 25 mM pH 7,0. Porém, a utilização de PEVA-CM-Asp sem metal promoveu a adsorção de IgA, IgM e pequena quantidade de transferrina. Além disso, os melhores resultados em PEVA-CM-Asp está associado ao uso de um tampão de alto custo, sendo o Mops e o Mes um tampão de quatro a cinco vezes mais caro que o Tris. Todavia, a utilização do adsorvente PEVA-CM-Asp apresenta a vantagem da falta de risco da contaminação das soluções protéicas por desprendimento de íons metálicos ao meio. Desta forma, ainda há a possibilidade da utilização de PEVA-CM-Asp em processos de remoção de IgG do plasma humano em pacientes com doenças auto-imunes e mielomas. No entanto, estudos mais aprofundados devem ser realizados a fim de comprovar a eficiência do sistema para este fim.

Comparando-se esses resultados com os obtidos utilizando-se proteína A e G como ligante (anexo L e M) observa-se que os resultados obtidos para PEVA-CM-Asp obtiveram menor seletividade. Porém, ainda que a seletividade tenha sido menor, o CM-Asp apresenta as vantagens da cromatografia de troca iônica em relação à cromatografia de afinidade. Como uma primeira etapa de purificação, os resultados mostram-se satisfatórios. Experimentos adicionais para determinação da capacidade máxima de adsorção e experimentos em módulo PEVA-CM-Asp devem ser realizados a fim de comprovar a eficiência do sistema. A utilização do módulo pode, ainda, evitar a adsorção de IgM, já que a molécula de IgM (900 kDa) é grande o suficiente para não atravessar os poros da membrana (tamanho nominal de corte de 600 kDa).

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES

A cromatografia por íons metálicos imobilizados em membranas de PEVA foi investigada, neste trabalho, como uma técnica potencialmente viável para a purificação de IgG a partir de solução de plasma humano em alternativa a métodos tradicionalmente estudados que utilizam géis de agarose como suporte e ao método de Cohn, utilizado em escala industrial para purificação de IgG. Neste trabalho, foi avaliado o efeito dos agentes quelantes IDA, TREN e CM-Asp imobilizados em membranas de PEVA para a purificação de IgG a partir do plasma humano.

Verificou-se que o sistema tamponante influencia na seletividade e no perfil de eluição de IgG em PEVA-AQ-Me(II). As melhores condições de purificação foram encontradas com os módulos de filtração PEVA-IDA-Ni(II) e PEVA-CM-Asp-Ni(II) em presença do tampão Tris-HCl 25 mM pH 7,0 e eluição por acréscimo da concentração de Tris até 700 mM. Obteve-se a uma capacidade média de adsorção dinâmica para IgG de 43 e 53 mg/g seca de membrana (para PEVA-IDA-Ni(II) e PEVA-CM-Asp-Ni(II), respectivamente) e um grau de purificação médio de 90% (IgG/ proteína total) para ambos adsorventes. Tanto para PEVA-IDA-Ni(II) como para PEVA-CM-Asp-Ni(II), a análise nefelométrica não acusou a presença de IgA nas frações de eluição, proteína que potencialmente causaria maior sintomas alérgicos no indivíduo. A utilização da matriz membranas de PEVA inseridas em módulos de filtração proporcionaram capacidade de adsorção de IgG comparáveis a utilização da matriz agarose e ainda a vantagem da maior seletividade e alta capacidade hidrodinâmica.

Além disso, os resultados apresentados neste trabalho apontaram a potencialidade da utilização do adsorvente PEVA-CM-Asp sem a utilização de íons metálicos imobilizados para a purificação de IgG e ainda para tratamentos extracorpóreos. Todavia, o bom resultado de PEVA-CM-Asp está associado ao uso de um tampão de alto custo, sendo o Mops e o Mes um tampão 4 a 5 vezes mais caro que o Tris.

O ajuste dos parâmetros do modelo de Langmuir aos dados experimentais de equilíbrio de adsorção de IgG nas membranas de PEVA-IDA-Ni(II) e PEVA-CM-Asp-Ni(II) forneceu valores de K_d característicos de sistemas de pseudobioafinidade e altas capacidades máxima de adsorção (Q_m). O estudo termodinâmico para adsorção de IgG em PEVA-IDA-Ni(II) (adsorvente modelo) realizado, demonstrou a complexidade e multiplicidade das interações entre IgG e o adsorvente. Os valores de ΔH° e ΔS° encontrados indicaram a prevalência de interações hidrofóbicas no sistema, porém devido a heterogeneidade da matriz e das ligações proteína – proteína e proteína – matriz, as interações eletrostáticas e ligações de coordenação não são excluídas.

A utilização de íons metálicos imobilizados em membranas PEVA demonstrou resultados de purificação comparáveis aos resultados obtidos utilizando-se ligantes bioespecíficos (proteína A e G) imobilizados em géis de agarose tradicionalmente estudados para purificação de IgG de diversas fontes em uma única etapa. Além disso, os adsorventes preparados a partir de membranas de PEVA apresentam, ainda, as vantagens em relação aos adsorventes bioespecíficos tradicionalmente utilizados: melhores condições cromatográficas (baixo tempo de processamento já que as membranas de PEVA suportam vazões superiores à agarose sem o risco de compressão do leito), condições brandas de eluição (os ligantes proteína A e G necessitam de condições drástica de eluição a baixos pHs), baixo custo e ainda a possibilidade de armazenamento com baixa contaminação microbiana, além da possibilidade de usar diversos ciclos sem perda de capacidade (estabilidade), favorecendo, desta forma, a sua utilização em processos de larga escala.

O processo industrialmente utilizado para a obtenção de IgG para uso clínico, consiste da precipitação com etanol (método de Cohn *et al*, 1946) seguido de técnicas cromatográficas. Neste processo, várias etapas de precipitação em batelada são realizadas variando-se o pH, a temperatura e a concentração de etanol, obtendo-se IgG ligeiramente contaminada por outras proteínas do plasma humano. Desta maneira, é necessário a utilização de técnicas mais seletivas, (como a cromatografia de afinidade) ao final do processo. Neste trabalho, conseguiu-se purificar IgG com 90% de pureza em uma única etapa, utilizando-se de uma técnica que permite alta capacidade hidrodinâmica (módulos de escala comercial, 2 m² de área, suportam vazões de entrada e de filtração de até 300 e 100 mL/min respectivamente) e seletividade, demonstrando a alta potencialidade da utilização

do método desenvolvido neste trabalho para a purificação de IgG a partir do plasma humano em processos industriais.

CAPÍTULO 6

SUGESTÕES PARA OS PRÓXIMOS TRABALHOS

Diante da alta potencialidade do emprego da técnica investigada neste trabalho para a purificação de IgG a partir de solução de plasma humano por meio da cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados, torna-se relevante a continuação da pesquisa envolvendo este tema. Sugere-se então:

- Análise mais apurada das frações de eluição dos experimentos realizados em PEVA-CM-Asp-Ni(II) e PEVA-IDA-Ni(II), em presença do tampão Tris-HCl 25 mM pH 7,0, para detecção de possíveis contaminantes por meio de análise em HPLC e verificação da contaminação por desprendimento de íons metálicos nas frações;
- Realização de experimentos em módulos comerciais de larga escala;
- Realização de estudos termodinâmicos para verificação da natureza da adsorção em PEVA-CM-Asp-Ni(II);
- Continuação dos estudos utilizando-se o agente quelantes CM-Asp como ligante: teste de outras condições tamponantes, tais como eluição gradiente da concentração de NaCl, a fim de proporcionar maior seletividade para a purificação de IgG; verificação da possibilidade da utilização deste adsorvente em tratamento extracorpóreo para remoção seletiva de IgG; realização de experimentos em módulo de PEVA-CM-Asp;
- Realização de estudos termodinâmicos para verificação da natureza da adsorção em PEVA-CM-Asp.

CAPÍTULO 7

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACCONCI, C. Processo de remoção de endotoxina de soros hiperimunes, filtração em membrana de afinidade. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 1998. 112p. Dissertação de Mestrado.
- ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. & WATSON, J.D. *Biologia Molecular da Célula*. Porto Alegre, editora Artmed, 3ª edição, p. 1196-1251, 1997.
- Anbio – Associação Nacional de Biossegurança, www.anbio.org.br/pdf/2/tr07_hemoderivados.pdf, acessado em agosto 2006.
- ANDRADE D. & HLADY V. Plasma protein adsorption: the big twelve. *Annals New York Academy of Science*, vol. 516, p. 158-172, 1987
- ANDRADE, J.D. *In Surface and Interfacial Aspect of Biomedical Polymer*. Vol. 2, p. 1-80, Plenum Press, New York, 1985.
- ANSPACH, F.B.; PETSCH, D. & DECKWER, W.D. Purification of murine IgG1 on group specific affinity sorbents. *Bioseparation*, vol. 6 p. 156-184, 1996.
- AQUINO, L.C.L. Purificação de pró-insulina humana recombinante com cauda de poli(histidina): cromatografia em membranas de afinidade com íons metálicos imobilizados. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2004. 126p. Tese (Doutorado).
- AXEN, R. J., J. PORATH & S. ERNBACK. Chemical coupling of peptides and polysaccharides by means of cyanogen halides. *Nature*. vol. 214, p. 1302-1307, 1967

- BAMFORD, C.H., AL-LAMEE, K. G., PURBRICK, M. D. & WEAR, T. J. Studies of a novel membrane for affinity separation, I. Functionalisation and protein coupling. *Journal of Chromatography*, vol. 606, p. 19-31, 1992.
- BELEW, M., YIP, T.T., ANDERSSON, L. & PORATH, J. Interaction of proteins with immobilized Cu(II) – Quantization of adsorption capacity, adsorption-isotherms and equilibrium-constants by frontal analysis. *Journal of Chromatography*, vol. 403, p. 197-206, 1987.
- BELEW, M. & PORATH, J. Immobilized metal ion affinity chromatography – effect of solute structure, ligand density and salt concentration on the retention of peptides. *Journal of Chromatography*, vol. 516, n. 2, p. 333-354, 1990.
- BODEN, V., WINZERLING J. J., VIJAYALAKSHMI, M., & PORATH J. Rapid one-step purification of goat immunoglobulins by immobilized metal ion affinity chromatography. *Journal of Immunological Methods*, vol. 181 p. 225-232, 1995.
- BOSCHETTI, E. The use of thiophilic chromatography for antibody purification: a review. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, vol. 49, p. 361-389, 2001.
- BOSSI, A. & RIGHETTI, P. G. Generation of peptide maps by capillary zone electrophoresis in isoelectric iminodiacetic acid. *Electrophoresis*, vol. 18, n. 11, p. 2012-2018, 1997.
- BOYLE, M. D. P., REIS & K. J. Bacterial Fc receptors. *Biotechnology*, vol. 5, n. 7, p. 697-703, 1987.
- BOYLE, M.D.P., FAULMANN, E.L. & METZGER, D.W. Application of bacterial immunoglobulin-binding proteins to the purification of immunoglobulin. *Molecular Interaction in Bioseparations*, p. 91-112, 1993.
- 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*, vol. 72 p. 248-254, 1976.

- BRANDT, S., GOFFE, R.A., KESSLER S. B., O'CONNOR, J. L. & ZALE, S.E., Membrane-based affinity technology for comercial scale purification. *Bio/Technology*, vol. 6, p. 779-82, 1988.
- BUENO, S.M.A., HAUPT, K. & VIJAYALAKSHMI, M. *In vitro* removal of human IgG by pseudobiospecific affinity membrane filtration on a large scale. A preliminary report. *The International Journal of Artificial Organs*, vol. 18, n. 7, p. 392-398, 1995 (a).
- BUENO, S.M.A.; HAUPT, K. & VIJAYALAKSHMI, M. Separation of immunoglobulin G from human serum by pseudobioaffinity chromatography using immobilized L-histidine in hollow fibre membranes chromatography using immobilized L-histidine in hollow fibre membranes. *Journal of Chromatography B*, vol. 667, p. 57-67, 1995 (b).
- BUENO, S.M.A., LEGALLAIS, C., HAUPT, K. & VIJAYALAKSHMI, M. Experimental kinetic aspect of hollow fiber membrane-based pseudobioaffinity filtration: process for IgG separation from human plasma. *Journal of Membrane Science*, vol. 117, p. 45-56, 1996.
- BURTON , D. R. Immunoglobulin G: functional sites. *Molecular Immunology*, vol, 22, p. 161-206, 1985
- BURTON , D. R, GREGORY, L. & JEFFERIS, R. Aspect of the molecular structure of the IgG subclasses. *Monograph Allergy*, vol 19, p. 7-35, 1986
- BURNOUF, T. Chromatography in plasma fractionation: benefits and future trends. *Journal of Chromatography B*, vol. 664, p. 3-15, 1995.
- BURNOUF, T. & RADOSEVICH, M. Affinity chromatography in the industrial purification of plasma proteins for therapeutic use. *Biochemical and Biophysical Methods*, vol. 49, p. 575-586, 2001
- CASTILHO, L.,DECKWER, W.D. & ANSPACH, F.B. Influence of matrix activation and polymer coating on the purification of human IgG with protein A affinity membranes. *Journal of Membrane Science*, vol. 172, p. 269-277, 2000.

- CASTILHO, L., ANSPACH, F.B., DECKWER, W.D. Comparison of affinity membranes for the purification of immunoglobulins. *Journal of Membrane Science*, vol. 207, p. 253-264, 2002
- ÇANAK Y, OZKARA, S., AKGOL, S. & DENIZLI, A. Pseudo-specific bioaffinity chromatography of immunoglobulin-G. *Reactive & Functional Polymers*, vol. 61, p. 369-377, 2004
- CHAGA, G.S. Twenty-five years of immobilized metal ions affinity chromatography: past, present and future. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, vol.49, p. 313-334, 2001.
- CHAGA, G.; HOPP, J. & NELSON, P. Immobilized metal ion affinity chromatography on Co^{2+} -carboxymethylaspartate-agarose Superflow, as demonstrated by one-step purification of lactate dehydrogenase from chicken breast muscle. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, vol. 29, p. 19-24, 1999.
- CHARCOSSET C., SU, Z., KAROOR, S., DAUN, G. & COLTON, C. Protein A immunoaffinity hollow fiber membrane for immunoglobulin G purification: experimental characterization. *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 48, p. 415-427, 1995.
- CHARCOSSET C. Purification of proteins by membrane chromatography. *Journal of Chemical and Technological Biotechnology*, vol.71, p. 95-10, 1998.
- COFFINIER, Y., LEGALLAIS, C. & VIJAYALAKSHMI, M. Separation of IgG from human plasma using thiophilic hollow fiber membranes. *Journal of Membrane Science*, vol. 5312, p. 1-10, 2002.
- COFFINIER, Y., & VIJAYALAKSHMI, M. Mercaptoheterocyclic ligands on a poly(ethylene vinyl alcohol) membrane for the purification of immunoglobulin G in a salt independent thiophilic chromatography. *Journal of Chromatography B*, vol. 808, p. 51-56, 2004
- COHN, E.J.; STRONG, L.E.; HUGHES JR., W.L.; MULFORD, D.J. & ASHWORTH, J.N.; MELIN, M. TAYLOR, H.L. Preparation and properties of serum and plasma

- protein. IV. A system for the separation into fractions of protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids. *Journal of American Chemical Society*, vol. 8, p. 459-475, 1946.
- DANCETTE, O.P.; TABOUREAU, J.-L.; TOURNIER, E. & CHARCOSSET, C.; BLOND, P. Purification of immunoglobulins G by protein A/G affinity membrane chromatography. *Journal of Chromatography B*, vol. 723 p. 61-68, 1999.
- DUARTE, I. S.; ZOLLNER, R. L. & BUENO, S. M. A. Protein L-agarose for adsorption of autoantibodies: a potential tool for extracorporeal treatment. *Artificial Organs*, vol. 29 n. 4, p. 313-323, 2005.
- DUARTE, I.S. Remoção de auto-anticorpos de amostras séricas: iminoadsorção utilizando proteína L como ligante. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2001. Dissertação de Mestrado.
- EL-KAK, A. & VIJAYALAKSHMI, M.A. Separation and purification of IgG1 and IgG2 from IgG-Cohn-II fraction of human plasma by pseudobioaffinity chromatography on histidyl-AH-Sepharose. *Bioseparation* 3, p. 47-53, 1992.
- ERNTELL M, MYHRE E. B, SJOBRING U & BJORCK. Streptococcal protein G has affinity for both Fab and Fc fragments of human IgG. *Molecular Immunology*, vol. 25, p. 121-126, 1988
- FINGER, U.B.; THOMMES, J.; KINZELT, D. & KULA, M.R. Application of thiophilic membranes for the purification of monoclonal antibodies from cell culture media. *Journal of Chromatography B*, vol. 664 p. 69-78, 1995.
- FINETTE, G.M.S., MAO, Q.M. & HEARN, M.T.H. Comparative studies on isothermal characteristics of proteins adsorbed under batch equilibrium conditions to ion-exchange, immobilized metal ion affinity and dye affinity matrices with different ionic strength and temperature conditions. *Journal of Chromatography A*, vol. 763, p. 71-90, 1997

- GABERC-POREKAR, V. & MENART, V. Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, vol. 49, p. 335-360, 2001.
- GAGNON, P. *Purification tools for monoclonal antibodies*. Editora: Tuscon, validated Biosystems, 254p, 1994.
- GHOSH, R. Bioseparation using supported liquid membrane chromatography. *Journal of Membrane Science*, vol. 192, p. 243-247, 2001.
- GUISAN, J.M. & BLANCO, R.M. Stabilization of trypsin by multiple-point attachment to aldehyde-agarose gels. *Annals of the New York Academy of Science*, vol. 501, p. 67-72, 1987
- HAHN, A. Sangue Bom. *Química e Derivados*. p. 10-14, setembro, 2004.
- HALE, J.E. & BEIDLER, D.E. Purification of humanized murine and murine monoclonal antibodies using immobilized metal-affinity chromatography. *Analytical Biochemistry*, vol. 222 p. 29-33, 1994.
- HARI, P.R., PAUL, W. & SHARMA, C.P. Adsorption of Human IgG on Cu(II)-immobilized cellulose affinity membrane: Preliminary study. *Journal of Biomedical Mater. Res.* vol. 50, p. 110-113, 2000.
- HAUPT, K., BUENO, S.M.A. & VIJAYALAKSHMI, M. Interaction of human immunoglobulin G with L-histidine immobilized onto poly(ethylene vinyl alcohol) hollow-fiber membranes. *Journal of Chromatography B*, vol. 674, p. 13-21, 1995.
- HAUPT, K. & BUENO, S.M.A. Affinity membrane- *In Encyclopaedia of separation science*. Academic Press, London p. 229-235, 2000.
- HE, W., LI, Y., SI, H., DONG, Y., SHENG, F., YAO, X. & HU, Z. Molecular modeling and spectroscopic studies on the binding of guaiacol to human serum albumin. *J. of Photochemical and Photobiology A: Chemistry*. In Press, 2006

- HOCHULI, E.; BANNWARTH, W.; BOBELI, H.; GENTZ, R. & STUBER, D. Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelate adsorbent *Biotechnology*, vol. 6 p.1321-1325, 1988
- HOU, K.C., ZANIEWSKI, R. & ROY, S. Protein A immobilized affinity cartridge for immunoglobulin purification. *Biotechnology Applied Biochemistry*, vol. 13 pg. 257-268, 1991.
- HUSE, K., BÖHME H.J. & SCHOLZ, G.H. Purification of antibody by affinity chromatography. *Journal of Biochemical Biophysics Methods*, vol. 51, p. 217-231, 2002.
- HUTCHENS, T. W. & PORATH J. Thiophilic adsorption of immunoglobulins- analysis of conditions optimal for selective immobilization and purification. *Analytical Biochemistry*, vol. 159, p. 217-226, 1986.
- HUTCHENS, T. W. & PORATH J. Thiophilic adsorption: a comparison of model protein behavior. *Biochemistry*, vol. 26, p. 7199-7204, 1987.
- JOHNSON R.D & ARNOLD F.H. Multipoint binding and heterogeneity in immobilized metal affinity chromatography. *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 48, p. 437-443, 1995.
- KIM, M., SAITO, K., FURUSAKI, S. SATO, T., SUGO T. & ISHIGAKI, I. Adsorption and elution of bovine γ -globulin using an affinity membrane containing hydrophobic amino acids as ligands. *Journal of Chromatography*, vol. 585, p 45-51, 1991 (a).
- KIM, M., SAITO, K., FURUSAKI, S., SUGO T. & ISHIGAKI, I. Protein adsorption capacity of a porous phenylalanine-containing membrane based on a polyethylene matrix. *Journal of Chromatography*, vol. 586, p 27-33, 1991 (b).
- KLEIN E. *Affinity Membranes : Their Chemistry and Performance in Adsorptive Separation Processes*. John Wiley and Sons Inc., New York, p. 15-25, 1991.

- KLEIN E; EICHHOLZ. E.; THEIMER, F.& YEAGER, D. Chitosan modified sulfonated poly(ethersulfone) as a support for affinity separations. *Journal of Membrane Science*, vol. 95 p. 199-204, 1994.
- LANGLOTZ, P. & KRONER, K. H. Surface-modified membran as a matrix for protein purification. *Journal of Chromatography*, vol. 591, p. 107-113, 1992.
- LANGMUIR, I. The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum. *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 40, p. 1361-1403, 1918.
- LIHME, A. & HANSEN, M.B. Protein A mimetic for large scale monoclonal antibody purification. *Am Biotechnol Lab*, vol. 15, p. 30-32, 1997.
- LOGHEM, V. Staphylococcal protein A and human IgG subclasses and allotypes. *Scand J. Immunol*, vol. 15 p. 275, 1982.
- MANTOVAARA, T.; PERTOFT, H. & PORATH, J. Carboxymethylated aspartic acid agarose, a selective adsorbent for calcium-binding proteins, preliminary studies. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, vol. 13, p. 315-322, 1991.
- MYHRE EB, ERNTELL M. A non-immune interaction between the light chain of human immunoglobulin and a surface component of a *Peptococcus magnus* strain. *Molecular Immunology*, vol.22 p. 879-885, 1985.
- MORRISSEY, J.H. Silver stain for protein in polyacrilamide gels: A modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Analytical Biochemistry*, vol. 117, p. 301-310, 1981.
- NILSON, B.H.K.; LOGDEMB, L.; KASTERN, W.; BJÖRK, L. & AKERSTRÖM, B. Purification of antibodies using protein L-binding framework structures in the light chain variable domain. *Journal of Immunological Methods*, vol. 164, p. 33-40, 1993.
- NOPPER B., KOHEN, F. & WILCHEK, M. A thiophilic adsorbent for the one-step high-performance liquid chromatography purification of monoclonal antibodies. *Analytical Biochemistry*, vol. 180, p. 66-71, 1989.

- OSCARSSON S. & PORATH, J. Covalent chromatography and salt-promoted thiophilic adsorption. *Analytical Biochemistry*, vol. 176, p. 330-337, 1989.
- PETSCH, D. DECKWER, W.D; ANSPACH, F.B. LEGALLAIS, C. & VIJAYALAKHIMI, M. Endotoxin removal with polyethyleneimine-immobilized adsorbers: Sepharose 4B versus flat sheet and hollow fibre membranes; *Journal of Chromatography B*, vol. 707, p. 121-130, 1998.
- PITOT, O., NEDONCHELLE, E., LEGALLAIS, C. & VIJAYALAKSHMI, M. Protein adsorption on histidyl-aminohexyl-Sepharose 4B II. Application to the negative one-step affinity purification of human β 2-microglobulin and immunoglobulin G. *Journal of Chromatography B*, vol. 758, p. 173-182, 2001.
- PORATH J, AXEN R & ERNBACK S. Chemical coupling of proteins to agarose. *Nature*. vol. 215, p.1491-1492, 1967
- PORATH, J.; CARLSSON, J; OLSSON, I. & BELFRAGE G. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature*, vol. 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*, vol. 22, p. 1621-1630, 1983.
- PORATH J., MAISANO, F. & BELEW, M. Thiophilic adsorption - A new method for protein fractionation. *FEBS Lett.* vol. 185 p. 306-310, 1985.
- PORATH, J. IMAC – Immobilized metal ion affinity based chromatography *Trends in Analytical Chemistry*, vol. 7, no. 7, p.254-259, 1988.
- PUTNAM, F. W. *The plasma protein: structure, function, and genetic control.* Ed. Academic Press. New York, p. 1-55, 1975.

- ROPER, D.K. & LIGHTFOOT, E.N. Separation of biomolecules using adsorptive membranes. *Journal of Chromatography A*, vol.702, p. 3-26, 1995.
- SAKURADA, Y., SUEOKA, A., KAWAHASHI, M. Blood purification device using membranes derived from poly(vinyl alcohol) and copolymer of ethylene and vinyl alcohol. *Polymer Journal*, vol. 19, n. 5, p. 501-513, 1987
- SADA, E. Engineering aspects of bioaffinity separation. *Journal of Chemical Engineering of Japan*. Vol.23 n.3, p. 259-269, 1990.
- SCHOLZ, G.H., WIPPICH, P., LEISTNER, S. & HUSE, K. Salt-independent binding of antibody from human serum to thiophilic heterocyclic ligands. *Journal of Chromatography B*, vol. 709 p. 189-196, 1998.
- SCOBLE, J.A. & SCOPES, R.K. Assay for determining the number of reactive groups on gels used in affinity chromatography and its application to the optimization of the epichloridrin and divinylsulfone activation reactions. *Journal of Chromatography A*. vol. 752, p. 67-76, 1996.
- 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 G₁ monoclonal antibody. *Journal of Chromatography B*, vol. 816, p. 259-268, 2005.
- SERPA, G. Purificação de anticorpos monoclonais do isotipo IgG1 através de afinidade por quelato metálico. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2002. 106p. Dissertação de mestrado,
- SERRES, A., MULLER, D & JOZEFONVICZ J. Purification of monoclonal antibodies on dextran-coated silica support grafted by thiophilic ligand. *Journal of Chromatography A*, vol. 771 p. 151-157, 1995.

- SHARMA, S. & AGARWAL, G. P. Interactions of proteins with immobilized metal ions: A comparative analysis using various isotherms models. *Analytical Biochemistry*, vol. 288, p. 126-140, 2001.
- SHARMA, S. & AGARWAL, G. Adsorption equilibrium and kinetics of egg-white proteins on immobilized metal ion affinity gels for designing fraction. *Adsorption*, vol. 8, p. 203-213, 2002.
- SMITH, J. M. & VAN NESS, H. C. *Introduction to chemical engineering thermodynamics*. New York, McGraw-Hill, 4ª edição, 698p, 1987.
- SULKOWSKI, E. The saga of IMAC and MIT. *BioEssays*, vol. 10, p. 170-175, 1989.
- THÖMMES J. & KULA M.R. Membrane Chromatography - an integrative concept in the downstream processing of proteins. *Biotechnology Progress*, vol.11, p. 357-36, 1995.
- TISHCHENKO, G.; DYBAL, J.; MESZAROSOVA, K.; SEDLAKOVA, Z.; BLEHA, M. Purification of the specific immunoglobulin G₁ by immobilized metal ion affinity chromatography using nickel complexes of chelating porous and nonporous polymeric sorbents based on poly(methacrylic esters). Effect of polymer structure. *Journal of Chromatography A*. vol. 954, p. 115-126, 2002.
- TORDOROVA-BALVAY, D., PITIOT, O. BOURHIM, M., SRIKRISHNAM, T. & VIJAYALAKSHMI, M. Immobilized metal-ion affinity chromatography of human antibodies and their proteolytic fragments, vol. 808, p. 57-62, 2004
- TURSKOVA, J. Bioaffinity chromatography. *Journal of Chromatography Library*, vol. 55, Amsterdam; London: Elsevier, 2ª edição 1993.
- UNARSKA, M.; DAVIES, P.A.; ESNOUF, M.P. & BELHOUSE, B.J. Comparative study of reaction kinetics in membrane and agarose bead affinity systems *Journal of Chromatography A*, vol. 519 p. 53-67, 1990.

- VANÇAN S., MIRANDA, E.A. & BUENO, S.M.A. IMAC of human IgG: studies with IDA-immobilized copper, nickel, zinc, and cobalt ions and different buffer systems. *Process Biochemistry*, vol. 37 p. 573-579, 2002.
- VIJAYALAKSHMI, M.A. Pseudobiospecific ligand affinity chromatography *Trends in Biotechnology*, vol. 7, p. 71-76, 1989.
- VLUG, A. & REMORTEL, V. P. The structure and function of human IgG subclasses. *American Clinical Laboratory*, vol. 8, p. 28-36, 1989
- YOSHIDA S., IOKA D., MATSUOKA, H., ENDO, H. & ISHII A. Bateria expressing single-chain immunoitoxin inhibit malaría parasite development in mosquitoes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol 17 p. 290-298, 2001.
- WALTERS, R. R. Affinity chromatography. *Analytical Chemistry*, vol.57 no.11, p. 1099-1114, 1985.
- WINZERLING, J.J.; BERNA, P. & PORATH, J. How to use immobilized metal ion affinity chromatography. *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, vol.4 p. 4-13, 1992.
- WONG, J., ALBRIGTH R.L. & WANG N. H. W. Immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC)-chemistry and bioseparation applications. *Separation and Purification Methods*, vol.20, p. 49-106, 1991.
- WU, C.Y., SUEN, S.Y., CHEN, S.C. & TZENG, J.H. Analysis of protein adsorption on regenerated cellulose-based immobilized copper ion affinity membranes. *Journal of Chromatography A*, vol. 996, p. 53-70, 2003
- ZENG, X. Membrane chromatography: preparation and application to protein separation. *Biotechnological Prog.*, vol. 15, pg. 1003-1019, 1999
- ZOU, H., LOU, Q. & ZHOU, D. Affinity membrane chromatography for the analysis and purification of proteins. *Journal of biochemical and Biophysical Methods*, vol. 49, p. 1199-240, 2001.

ANEXO A

Cromatogramas dos experimentos realizados para PEVA-IDA-Me(II), PEVA-TREN-Me(II) e PEVA-CM-Asp-Me(II) em presença do tampão Mops, Acetato (MA), 25 mM, contendo NaCl 1 M a pH 7,0. Eluição por decréscimo de pH.

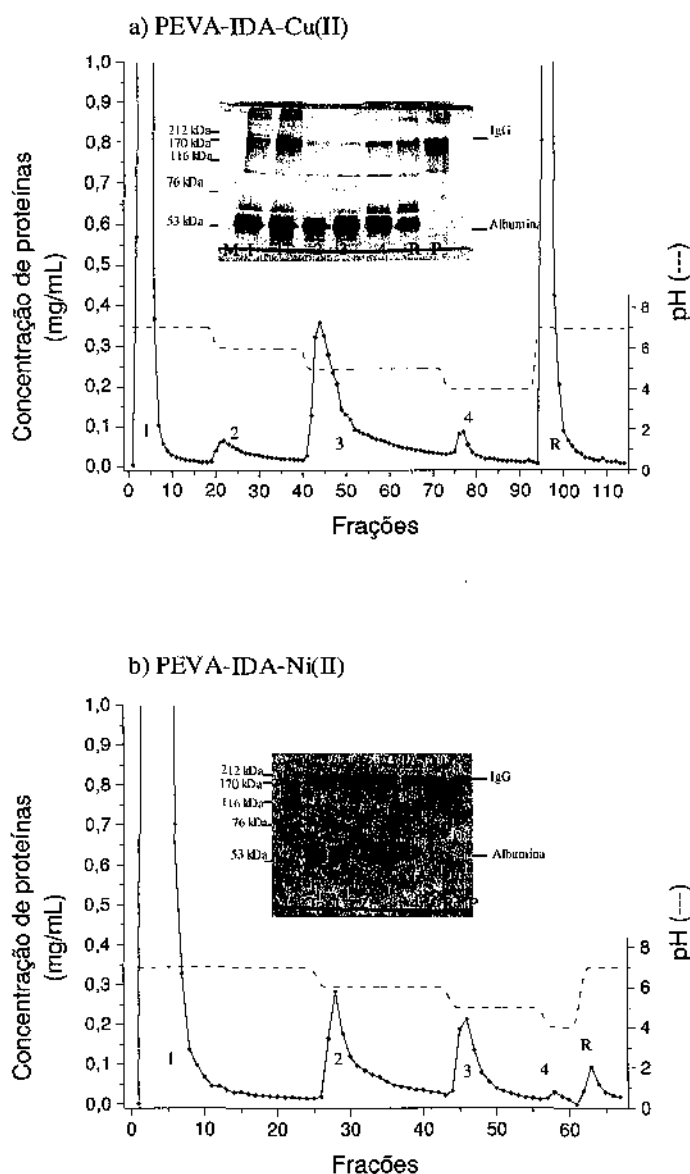


Figura A.1: Cromatografias realizadas com solução de plasma humano em PEVA-IDA-Me(II).a) Cu(II) e b) Ni(II). Volume de leite: 5 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Tampão de adsorção: MA 25 mM, NaCl 1 M pH 7,0; dessorção: gradiente degrau pH 6,0, pH 5,0 e pH 4,0; regeneração: EDTA 100 mM pH 7,0. Eletroforeses: (M) marcador de alta massa molecular, (I) material injetado, (1-4) correspondente aos pontos enumerados do cromatograma, (R) regeneração, (P) IgG de alta pureza (Aventis).

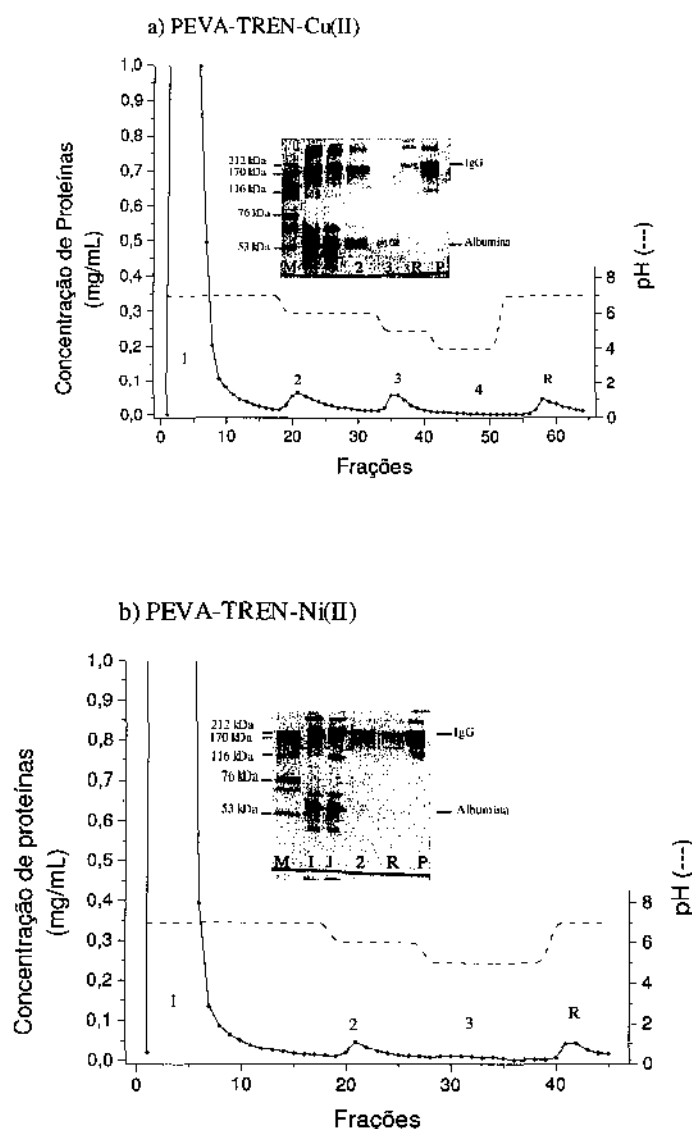


Figura A.2: Cromatografias realizadas com solução de plasma humano em PEVA-TREN-Me(II). a) Cu(II) e b) Ni(II). Volume de leito: 5 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Tampão de adsorção: MA 25 mM, NaCl 1 M pH 7,0; dessorção: gradiente degrau pH 6,0, pH 5,0 e pH 4,0; regeneração: EDTA 100 mM pH 7,0. Eletroforeses: (M) marcador de alta massa molecular, (I) material injetado, (1-2) correspondente aos pontos enumerados do cromatograma, (R) regeneração, (P) IgG de alta pureza (Aventis).

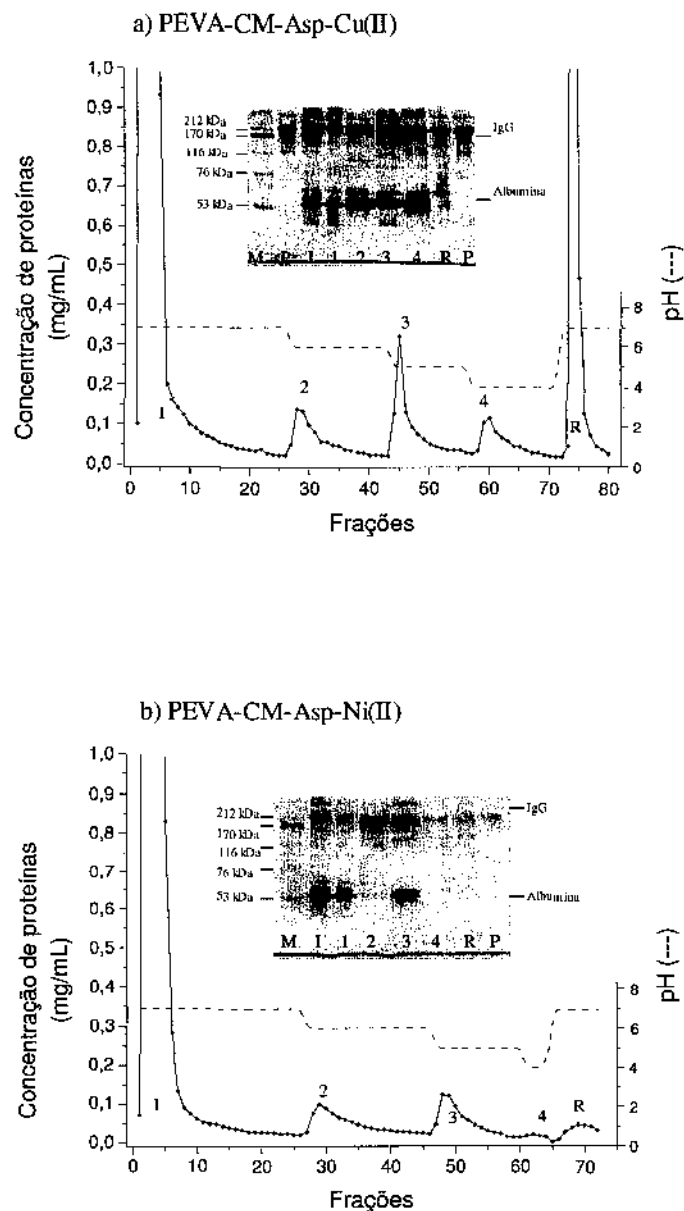


Figura A.3: Cromatografias realizadas com solução de plasma humano em PEVA-CM-Asp-Me(II). a) Cu(II) e b) Ni(II). Volume de leito: 5 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Tampão de adsorção MA 25 mM, NaCl 1 M pH 7,0; dessorção: gradiente degrau pH 6,0, pH 5,0 e pH 4,0; regeneração: mM EDTA 100mM pH 7,0. Eletroforeses: (M) marcador de alta massa molecular, (I) material injetado, (1-4) correspondente aos pontos enumerados do cromatograma, (R) regeneração, (P) IgG de alta pureza (Aventis).

ANEXO B

Balanço de massa dos experimentos realizados em PEVA-IDA-Me(II), PEVA-TREN-Me(II) e PEVA-CM-Asp-Me(II) em presença do tampão Mops, Acetato (MA), 25 mM, contendo NaCl 1 M a pH 7,0 para proteína total, albumina e IgG referentes aos cromatogramas do Anexo A

Tabela B.1: Balanço de massa para proteína total. Purificação de IgG a partir de plasma humano. Tampão de adsorção MA 25 mM, NaCl 1 M pH 7,0. Eluição: gradiente degrau de pH.

		Proteína total ¹	PEVA-IDA ²		PEVA-TREN ²		PEVA-CM-Asp ²	
			Cu(II)	Ni(II)	Cu(II)	Ni(II)	Cu(II)	Ni(II)
Injeção	(mg)		81,1	112,5	89,8	105,4	105,6	88,6
	(%)		100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Lavagem	(mg)		49,0	90,4	83,1	117,1	79,2	78,8
	(%)		60,4	80,4	92,5	111,1	75,0	88,9
Eluição	pH 6,0	(mg)	2,2	5,2	1,3	0,7	3,2	3,1
		(%)	2,7	4,6	1,4	0,6	3,0	3,7
	pH 5,00	(mg)	11,4	3,3	0,7	0,2	3,8	2,4
		(%)	14,0	2,9	0,8	0,2	3,6	2,7
	pH 4,0	(mg)	1,8	0,3	0,1	-	2,5	0,3
		(%)	2,3	0,3	0,1	-	2,4	0,3
Regeneração	(mg)		24,8	1,0	0,6	0,5	12,9	0,9
	(%)		30,5	0,9	0,6	0,5	12,2	1,0
Recuperação	(mg)		89,1	100,2	85,8	117,9	101,6	85,4
	(%)		109,9	89,1	95,5	12,0	96,2	96,4
Total adsorvido	(mg)		40,2	9,8	2,7	1,4	22,4	6,7
	(%)		49,6	8,7	3,0	1,3	21,2	7,6

¹ Dosagem pelo método de Bradford, ² volume do leite: 5 mL ou 1,25 g de membrana seca.

Tabela B.2: Balanço de massa para IgG e albumina humana. Purificação de IgG a partir de plasma humano. Tampão de adsorção: MA 25 mM, NaCl 1 M, pH 7,0. Eluição por gradiente degrau de pH.

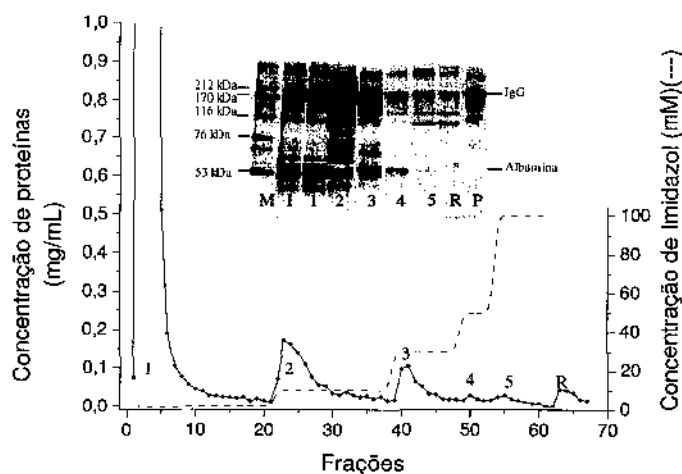
		PEVA-IDA - Ni(II) ⁴		PEVA-TREN- Ni(II) ⁴		PEVA-CM-Asp- Ni(II) ⁴		
		HSA ¹	IgG ²	HSA ¹	IgG ²	HSA ¹	IgG ²	
Injeção	(mg)	55,9	19,3	51,5	18,0	49,8	19,6	
	(%)	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	
Lavagem	(mg)	52,8	10,3	54,7	17,6	55,8	13,6	
	(%)	94,6	53,3	106,2	97,4	111,6	69,2	
Eluição	pH 6,0	(mg)	bt ³	3,9	bt ³	0,3	bt ³	3,4
		(%)	0,0	20,2	0,0	1,7	0,0	17,2
	pH 5,0	(mg)	bt ³	2,5	bt ³	bt ³	bt ³	1,8
		(%)	0,0	12,8	0,0	0,0	0,0	9,3
	pH 4,0	(mg)	bt ³	0,2	-	-	bt ³	0,5
		(%)	0,0	0,8	-	-	0,0	2,6
Regeneração	(mg)	bt ³	0,5	bt ³	0,1	bt ³	0,4	
	(%)	0,0	2,4	0,0	0,6	0,0	1,8	
Recuperação	(mg)	52,8	17,3	54,7	17,9	55,8	19,7	
	(%)	94,6	89,6	106,2	99,3	11,6	100,1	
Total adsorvido	(mg)	0,0	7,1	0,0	0,4	0,0	6,1	
	(%)	0,0	36,2	0,0	2,2	0,0	31,1	

¹HSA, albumina do soro humano, ²IgG, imunoglobulina G humana, ³bt, abaixo do limite detectável, ⁴volume do leito 5 mL ou 1,25 g de membrana seca.

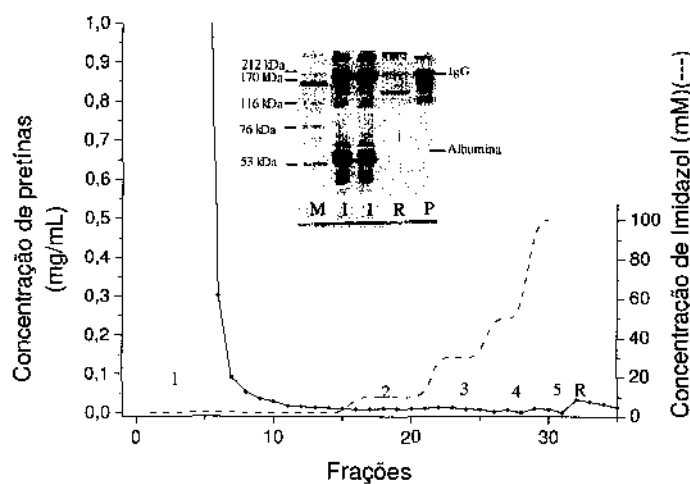
ANEXO C

Cromatogramas dos experimentos realizados para PEVA-IDA-Ni(II), PEVA-TREN-Ni(II) e PEVA-CM-Asp-Ni(II) em presença do tampão Mops 25 mM imidazol 2 mM contendo NaCl 1 M a pH 7,0. Eluição por acréscimo da concentração de imidazol.

a) PEVA-IDA-Ni(II)



b) PEVA-TREN-Ni(II)



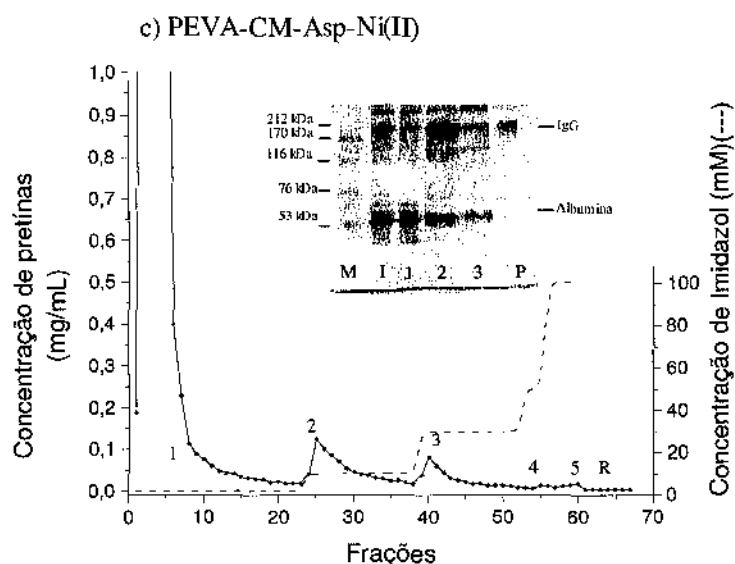


Figura C.1: Cromatografias realizadas com solução de plasma humano em: a) PEVA-IDA-Ni(II), b) PEVA-TREN-Ni(II) e c) PEVA-CM-Asp-Ni(II). Volume de leito: 5 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Tampão de adsorção: Mops 25 mM, imidazol 2 mM, NaCl 1 M pH 7,0; dessorção: gradiente degrau do aumento da concentração de imidazol: 10, 30, 50 e 100 mM; regeneração: EDTA 100 mM pH 7,0. Eletroforeses: (M) marcador de alta massa molecular, (I) material injetado, (1-5) correspondente aos pontos enumerados do cromatograma, (R) regeneração, (P) IgG de alta pureza (Aventis).

ANEXO D

Balanço de massa dos experimentos realizados em PEVA-IDA-Ni(II), PEVA-TREN-Ni(II) e PEVA-CM-Asp-Ni(II) em presença do tampão Mops 25 mM, imidazol 2 mM contendo NaCl 1 M a pH 7,0 para proteína total, albumina e IgG referentes aos cromatogramas do Anexo C.

Tabela D.1: Balanço de massa para proteína total. Purificação de IgG a partir de plasma humano. Tampão de adsorção: Mops 25 mM, imidazol 2 mM, NaCl 1 M pH 7,0. Eluição: gradiente degrau de imidazol

		Proteína total ¹	PEVA-IDA-Ni(II)	PEVA-TREN-Ni(II)	PEVA-CM-Asp- Ni(II)
Injeção		(mg)	98,4	103,8	101,2
		(%)	100,0	100,0	100,0
Lavagem		(mg)	95,8	108,3	108,3
		(%)	97,2	104,4	108,0
Eluição	10 mM	(mg)	5,2	0,2	2,9
		(%)	3,7	0,2	2,9
	30 mM	(mg)	1,6	0,2	1,3
		(%)	1,6	0,1	1,3
	50 mM	(mg)	0,3	0,0	0,1
		(%)	0,3	0,0	0,1
	100 mM	(mg)	0,4	0,1	0,1
		(%)	0,4	0,1	0,1
Regeneração		(mg)	0,5	0,4	0
		(%)	0,5	0,4	0
Recuperação		(mg)	102,1	109,1	112,5
		(%)	103,8	105,2	111,1
Total adsorvido		(mg)	6,4	0,8	4,5
		(%)	6,5	0,8	4,5

¹ Dosagem pelo método de Bradford, ² volume do leito: 5 mL ou 1,25 g de membrana seca.

Tabela D.2: Balanço de massa para IgG e albumina humana. Purificação de IgG a partir de plasma humano. Tampão de adsorção Mops 25 mM, 2 mM imidazol, NaCl 1 M pH 7,0. Eluição: gradiente degrau de imidazol.

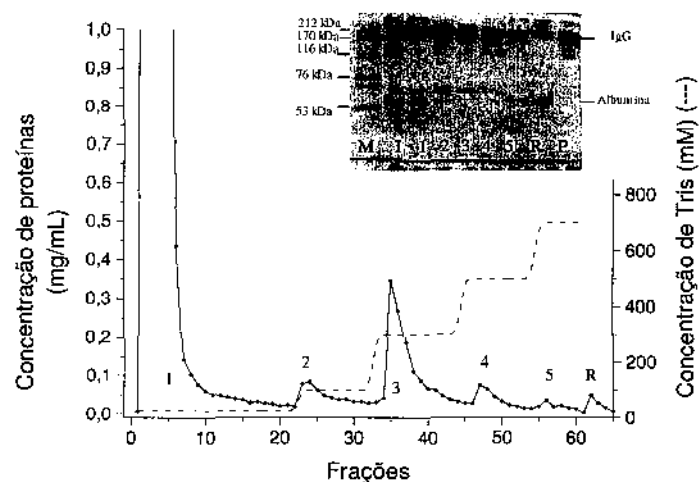
		PEVA-IDA-Ni(II)		PEVA-TREN-Ni(II)		PEVA-CM-Asp-Ni(II)	
		HSA ¹	IgG ²	HSA ¹	IgG ²	HSA ¹	IgG ²
Injeção	(mg)	56,6	19,2	54,2	18,9	57,21	19,3
	(%)	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Lavagem	(mg)	57,8	11,8	55,1	17,5	65,3	19,1
	(%)	102,0	61,6	101,7	92,6	113,7	98,8
10 mM	(mg)	bt ³	4,6	bt ³	bt ³	bt ³	2,0
	(%)	0,0	23,7	0,0	0,0	0,0	10,5
20 mM	(mg)	bt ³	1,0	bt ³	bt ³	bt ³	0,4
	(%)	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0	2,0
Eluição 30 mM	(mg)	bt ³	bt ³	bt ³	bt ³	bt ³	bt ³
	(%)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
50 mM	(mg)	bt ³	bt ³	bt ³	bt ³	bt ³	bt ³
	(%)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
100 mM	(mg)	bt ³	bt ³	bt ³	bt ³	bt ³	bt ³
	(%)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Regeneração	(mg)	bt ³	bt ³	bt ³	bt ³	bt ³	bt ³
	(%)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Recuperação	(mg)	57,8	17,3	55,1	17,5	65,3	21,5
	(%)	102,0	90,3	101,7	92,6	113,7	11,3
Total adsorvido	(mg)	0,0	5,5	0,0	0,0	0,0	2,4
	(%)	0,0	28,7	0,0	0,0	0,0	12,6

¹ HSA, albumina do soro humano, ² IgG, Imunoglobulina G, ³ bt, abaixo do limite detectável.

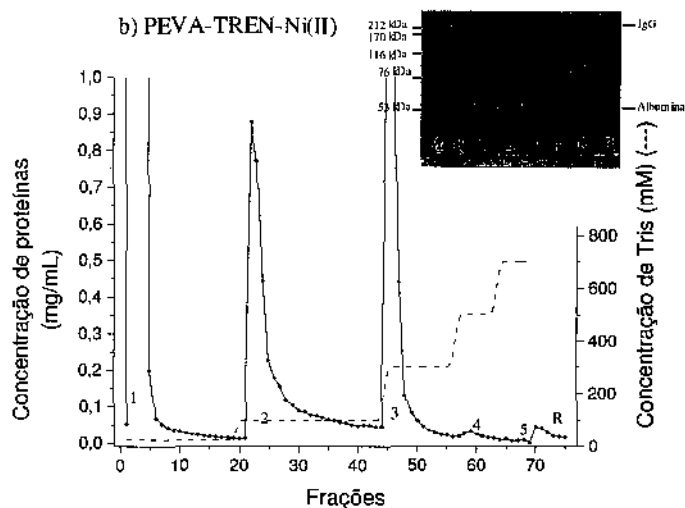
ANEXO E

Cromatogramas dos experimentos realizados para PEVA-IDA-Ni(II), PEVA-TREN-Ni(II) e PEVA-CM-Asp-Ni(II) em presença do tampão Tris-HCl 25 mM a pH 7,0. Eluição por acréscimo da concentração Tris.

a) PEVA-IDA-Ni(II)



b) PEVA-TREN-Ni(II)



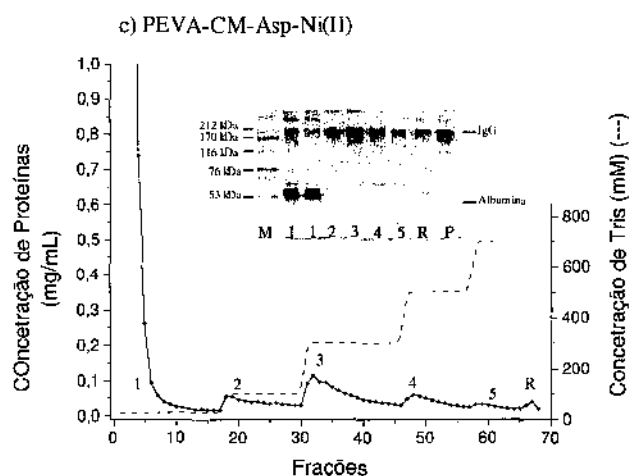


Figura E.1: Cromatografias realizadas com solução de plasma humano em a) PEVA-IDA-Ni(II), b) PEVA-TREN-Ni(II) e c) PEVA-CM-Asp-Ni(II). Volume de leito: 5 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Tampão de adsorção: Tris-HCl 25 mM pH 7,0; dessorção: gradiente degrau do aumento da concentração de Tris 100, 300, 500 e 700 mM; regeneração: EDTA 100 mM pH 7,0. Eletroforeses: (M) marcador de alta massa molecular, (I) material injetado, (1-5) correspondente aos pontos enumerados do cromatograma, (R) regeneração, (P) IgG de alta pureza (Aventis).

ANEXO F

Balanço de massa dos experimentos realizados em PEVA-IDA-Ni(II), PEVA-TREN-Ni(II) e PEVA-CM-Asp-Ni(II) em presença do tampão Tris-HCl a pH 7,0 para proteína total, albumina e IgG referentes aos cromatogramas do Anexo E.

Tabela F.1: Balanço de massa para proteína total. Purificação de IgG a partir de plasma humano. Tampão de adsorção: Tris-HCl 25 mM, pH 7,0. Eluição: gradiente degrau de Tris.

		Proteína total ¹	PEVA-IDA-Ni(II)	PEVA-TREN-Ni(II)	PEVA-CM-Asp- Ni(II)
Injeção		(mg)	110,2	107,9	91,1
		(%)	100,0	100,0	100,0
Lavagem		(mg)	110,3	90,1	89,6
		(%)	100,1	83,5	98,3
Eluição	100 mM	(mg)	2,2	15,1	2,4
		(%)	12,0	14,1	2,0
	300 mM	(mg)	6,3	12,6	5,5
		(%)	5,7	11,7	5,5
	500 mM	(mg)	1,4	0,5	2,0
		(%)	1,3	0,5	2,2
	700 mM	(mg)	0,5	0,1	0,9
		(%)	0,5	0,1	0,9
Regeneração		(mg)	0,5	0,7	0,4
		(%)	0,4	0,6	0,5
Recuperação		(mg)	121,3	119,23	100,8
		(%)	110,0	110,5	110,6
Total adsorvido		(mg)	10,9	29,0	11,2
		(%)	9,9	26,9	12,3

¹ Dosagem pelo método de Bradford, 1975

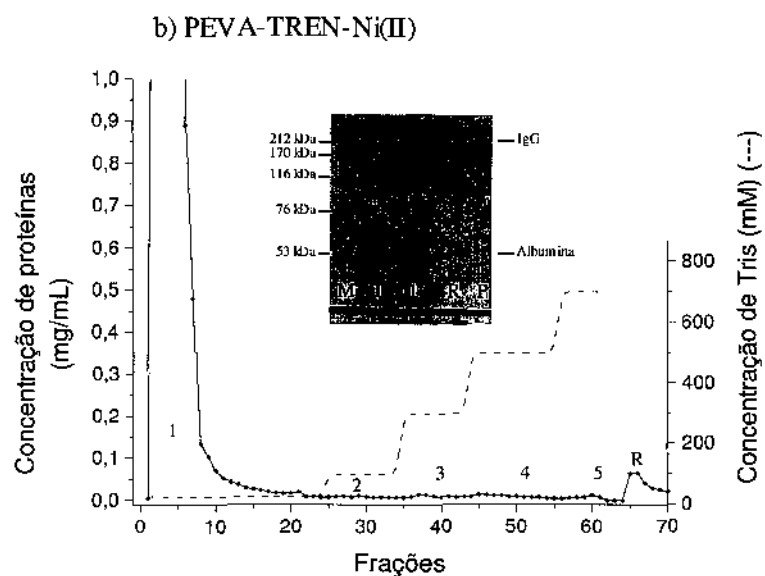
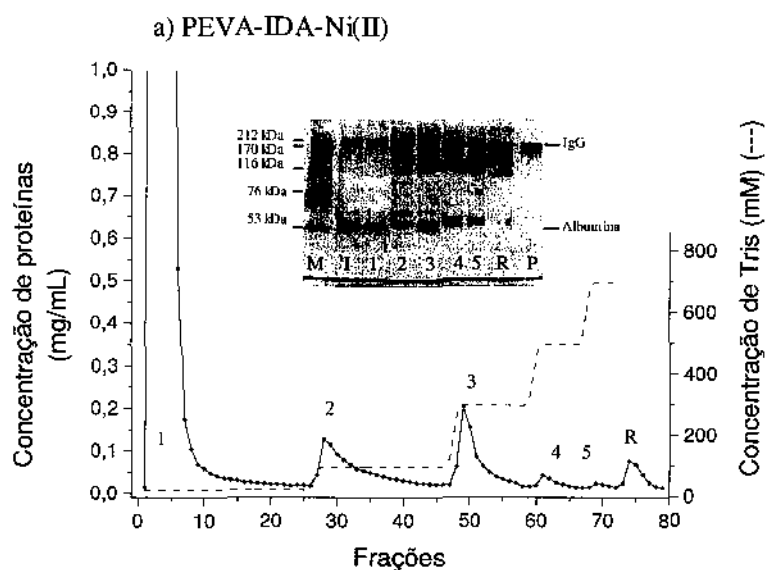
Tabela F.2: Balanço de massa para IgG e albumina. Purificação de IgG a partir de plasma humano. Tampão de adsorção: Tris-HCl 25 mM pH 7,0. Eluição: gradiente degrau de Tris.

		PEVA-IDA-Ni(II)		PEVA-TREN-Ni(II)		PEVA-CM-Asp-Ni(II)		
		HAS ¹	IgG ²	HAS ¹	IgG ²	HAS ¹	IgG ²	
Injeção	(mg)	53,6	18,2	50,4	16,7	54,7	17,5	
	(%)	100,0	100,0	100	100,0	100,0	100,0	
Lavagem	(mg)	59,8	11,0	33,3	14,09	57,3	7,2	
	(%)	111,6	60,6	66,2	84,6	104,6	41,1	
Eluição	100 mM	(mg)	bt ³	1,9	10,2	1,6	Bt ³	2,2
		(%)	0,0	2,0	20,7	9,3	0,0	12,4
	300 mM	(mg)	bt ³	5,7	8,8	0,8	bt ³	4,9
		(%)	0,0	31,6	17,4	4,3	0,0	27,7
	500 mM	(mg)	bt ³	1,1	bt ³	0,1	bt ³	1,6
		(%)	0,0	6,2	0,0	0,5	0,0	9,0
	700 mM	(mg)	bt ³	0,2	bt ³	bt ³	bt ³	0,6
		(%)	0,0	1,2	0,0	0,0	0,0	3,5
Regeneração	(mg)	bt ³	0,1	bt ³	bt ³	bt ³	0,3	
	(%)	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	1,7	
Recuperação	(mg)	58,9	20,1	52,3	16,4	57,3	16,7	
	(%)	111,6	110,5	103,8	98,7	104,6	95,3	
Total adsorvido	(mg)	0,0	9,0	19,0	2,4	0,0	9,6	
	(%)	0,0	49,5	37,7	14,6	0,0	54,6	

¹ HSA, albumina do soro humano, ² IgG, imunoglobulina G, ³ bt, abaixo do limite detectável.

ANEXO G

Cromatogramas dos experimentos realizados para PEVA-IDA-Ni(II), PEVA-TREN-Ni(II) e PEVA-CM-Asp-Ni(II) em presença do tampão Tris-HCl 25 mM contendo NaCl 1 M a pH 7,0. Eluição por acréscimo da concentração de Tris.



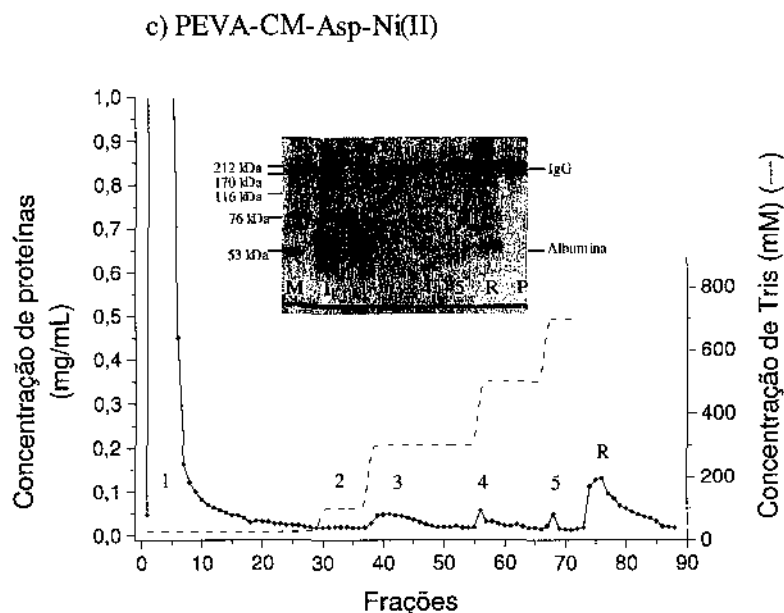


Figura G.1: Cromatografias realizadas com solução de plasma humano em a) PEVA-IDA-Ni(II), b) PEVA-TREN-Ni(II) e c) PEVA-CM-Asp-Ni(II). Volume de leite: 5 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Tampão de adsorção: Tris-HCl 25 mM, NaCl 1M pH 7,0; dessorção: gradiente degrau do aumento da concentração de Tris 100, 300, 500 e 700 mM; regeneração: EDTA 100 mM pH 7,0. Eletroforeses: (M) marcador de alta massa molecular, (I) material injetado, (1-5) correspondente aos pontos enumerados do cromatograma, (R) regeneração, (P) IgG de alta pureza (Aventis).

ANEXO H

Balanço de massa dos experimentos realizados em PEVA-IDA-Ni(II), PEVA-TREN-Ni(II) e PEVA-CM-Asp-Ni(II) em presença do tampão Tris-HCl a pH 7,0 contendo NaCl 1 M para proteína total, albumina e IgG referentes aos cromatogramas do Anexo E.

Tabela H.1: Balanço de massa para proteína total. Purificação de IgG a partir de plasma humano. Tampão de adsorção: Tris-HCl 25 mM, NaCl 1M, pH 7,0. Eluição: gradiente degrau de Tris.

		Proteína total ¹	PEVA-IDA-Ni(II)	PEVA-TREN-Ni(II)	PEVA-CM-Asp-Ni(II)
		(mg)			
Injeção		(%)	119,7	105,1	82,5
			100,0	100,0	100,0
Lavagem		(mg)	101,7	97,1	81,4
		(%)	85,0	92,4	98,7
Eluição	100 mM	(mg)	4,1	0,2	0,2
		(%)	3,4	0,2	0,2
	300 mM	(mg)	3,1	0,2	2,0
		(%)	2,6	0,2	2,4
	500 mM	(mg)	0,8	0,2	1,0
		(%)	0,7	0,2	1,3
	700 mM	(mg)	0,3	0,1	0,5
		(%)	0,3	0,1	0,6
Regeneração		(mg)	1,1	0,7	3,6
		(%)	0,9	0,7	4,4
Recuperação		(mg)	11,1	98,7	88,7
		(%)	92,8	93,8	107,5
Total adsorvido		(mg)	9,4	1,5	7,3
		(%)	7,9	1,5	8,8

¹ Dosagem pelo método de Bradford, 1975

Tabela H.2: Balanço de massa para IgG e albumina humana. Purificação de IgG a partir de plasma humano. Tampão de adsorção: Tris-HCl 25 mM, NaCl 1M, pH 7,0. Eluição: gradiente degrau de Tris.

		PEVA-IDA-Ni(II)		PEVA-TREN-Ni(II)		PEVA-CM-Asp-Ni(II)	
		HAS ¹	IgG ²	HAS ¹	IgG ²	HAS ¹	IgG ²
Injeção	(mg)	58,6	19,4	59,2	19,7	58,3	19,0
	(%)	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Lavagem	(mg)	55,0	10,6	57,5	18,5	56,3	13,8
	(%)	93,9	54,7	97,1	93,6	96,5	72,6
Eluição	100 mM	(mg)	bt ³	3,0	bt ³	bt ³	bt ³
		(%)	0,0	15,4	0,0	0,0	0,0
	300 mM	(mg)	bt ³	2,7	bt ³	bt ³	1,7
		(%)	0,0	13,9	0,0	0,0	8,9
	500 mM	(mg)	bt ³	0,4	bt ³	bt ³	0,8
		(%)	0,0	2,0	0,0	0,0	4,0
	700 mM	(mg)	bt ³	bt ³	bt ³	bt ³	0,2
		(%)	0,0	0,0	0,0	0,0	1,1
Regeneração	(mg)	bt ³	bt ³	bt ³	0,2	bt ³	1,9
	(%)	0,0	0,0	0,0	1,1	0,0	10,0
Recuperação	(mg)	55,0	16,7	57,5	18,7	56,3	18,3
	(%)	93,9	86,1	97,1	94,8	96,5	96,5
Total adsorvido	(mg)	0,0	6,1	0,0	0,2	0,0	4,6
	(%)	0,0	31,4	0,0	1,0	0,0	24,2

¹ HSA, albumina do soro humano, ² IgG, imunoglobulina G, ³ bt, abaixo do limite detectável

ANEXO I

Cromatogramas dos experimentos realizados para PEVA-CM-Asp em presença dos tampões: Tris-HCl 25 mM pH 7,0 e 8,0, Mops 25 mM pH 7,5 e Mes 25mM pH 6,5. Eluição por acréscimo de 1 M de NaCl ao tampão de adsorção.

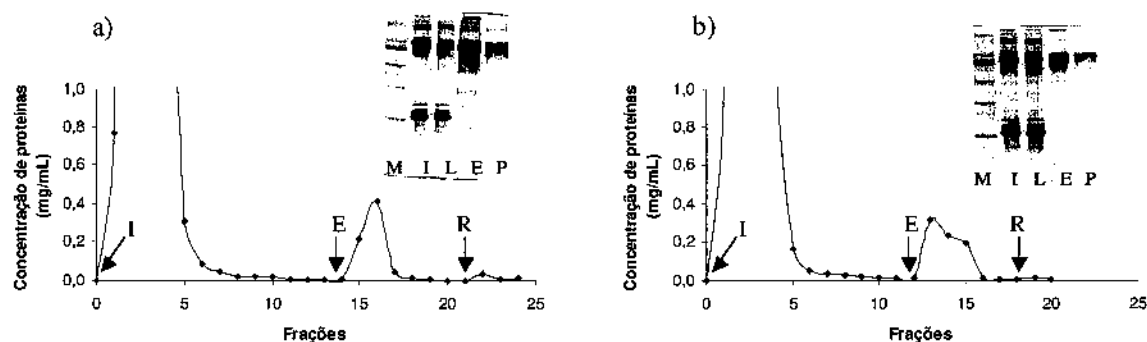


Figura I.1: Cromatografia de plasma diluído 1: 5 em PEVA-CM-Asp. Tampão de adsorção Tris-HCl 25mM a) pH 7,0, b) pH 8,0. M: marcador de alta massa molecular; I: injeção; L: lavagem; E: eluição por adição de NaCl 1 M ao tampão de adsorção; R: regeneração: NaOH 20 mM; P: IgG de alta pureza Aventis.

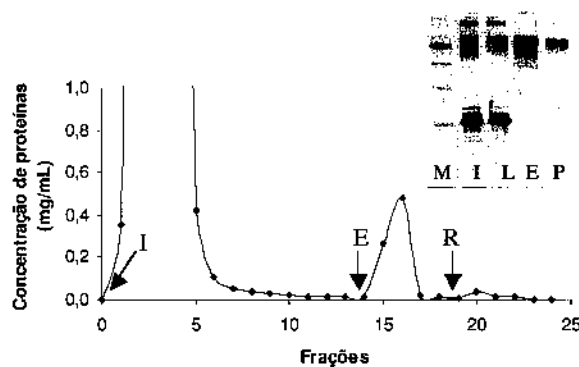


Figura I.2: Cromatografia de plasma diluído 1: 5 em PEVA-CM-Asp. Tampão de adsorção Mops 25mM pH 7,5. M: marcador de alta massa molecular; I: injeção; L: lavagem; E: eluição por adição de NaCl 1 M ao tampão de adsorção; R: regeneração, NaOH 20 mM; P: IgG de alta pureza Aventis.

ANEXO J

Balanço de massa dos experimentos realizados em PEVA-CM-Asp em presença do tampão Tris-HCl 25 mM pH 7,0 e 8,0, Mops 25 mM pH 7,5 e Mes 25 mM pH 6,5 referentes aos cromatogramas do Anexo I.

Tabela J.1: Balanço de massa para proteína total, IgG, IgA, IgM, transferrina e albumina humana. Tampão de adsorção: Tris 25 mM, pH 7,0.

		PT ¹	IgA ²	IgG ³	IgM ⁴	HSA ⁵	TRF ⁶	IgG/ PT (mg/mg)	Fator de purificação
Injeção	(mg)	117,0	6,0	20,1	2,0	57,1	3,6	0,17	1
	(%)	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0		
Lavagem	(mg)	115,9	5,7	16,7	1,4	58,4	3,4	0,14	0,82
	(%)	99,0	94,3	83,5	69,7	102,3	94,4		
Eluição	(mg)	5,9	0,3	4,9	0,6	bt ⁷	bt ⁷	0,83	4,89
	(%)	5,0	5,0	24,6	29,4	0,0	0,0		
Recuperação	(mg)	121,8	6,0	21,7	2,0	58,4	3,4	-	-
	(%)	104,1	99,3	108,1	99,2	102,3	94,4		

Tabela J.2: Balanço de massa para proteína total, IgG, IgA, IgM, transferrina e albumina humana. Tampão de adsorção: Tris 25 mM, pH 8,0.

		PT ¹	IgA ²	IgG ³	IgM ⁴	HSA ⁵	TRF ⁶	IgG/ PT (mg/mg)	Fator de purificação
Injeção	(mg)	129,7	6,3	20,8	2,5	58,7	3,8	0,16	1
	(%)	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0		
Lavagem	(mg)	122,7	5,6	17,5	1,8	51,2	3,5	0,14	0,88
	(%)	94,6	90,0	84,2	72,4	87,2	92,1		
Eluição	(mg)	4,0	0,2	3,4	0,4	bt ⁷	bt ⁷	0,85	5,31
	(%)	3,1	2,6	16,3	16,7	0,0	0,0		
Recuperação	(mg)	126,7	5,8	20,9	2,2	51,2	3,5	-	-
	(%)	97,7	92,6	100,4	89,1	87,2	92,1		

¹ PT, Proteína Total, dosagem pelo método de Bradford, 1975, ² IgA, imunoglobulina A, dosagem por nefelometria, ³ IgG, imunoglobulina G, dosagem por nefelometria, ⁴ Imunoglobulina M, dosagem por nefelometria, ⁵ HSA, albumina do soro humano, dosagem por nefelometria, ⁶ TRF, transferrina, dosagem por nefelometria, ⁷bt, abaixo do limite detectável

Tabela J.3: Balanço de massa para proteína total, IgG, IgA, IgM, transferrina e albumina humana. Tampão de adsorção: Mops 25 mM, pH 7,5. Eluição: Mops 25 mM, pH 7,5, 1 M NaCl

		PT ¹	IgA ²	IgG ³	IgM ⁴	HSA ⁵	TRF ⁶	IgG/ PT (mg/mg)	Fator de purificação
Injeção	(mg)	115,3	5,6	20,3	2,3	58,9	3,7	0,18	1
	(%)	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0		
Lavagem	(mg)	101,7	5,3	17,7	1,4	55,5	3,6	0,17	0,97
	(%)	88,2	94,7	87,1	61,1	95,0	97,6		
Eluição	(mg)	5,1	0,3	4,3	0,5	bt ⁷	bt ⁷	0,84	4,68
	(%)	4,4	4,6	21,0	18,0	0,0	0,0		
Recuperação	(mg)	106,8	5,6	22,0	1,9	55,5	3,6	-	-
	(%)	92,6	99,2	108,1	81,1	95,0	97,6		

¹ PT, Proteína Total, dosagem pelo método de Bradford, 1975, ² IgA, imunoglobulina A, dosagem por nefelometria, ³ IgG, imunoglobulina G, dosagem por nefelometria, ⁴ Imunoglobulina M, dosagem por nefelometria, ⁵ HSA, albumina do soro humano, dosagem por nefelometria, ⁶ TRF, transferrina, dosagem por nefelometria, ⁷bt, abaixo do limite detectável

ANEXO K

Gráficos de Scatchard para os experimentos de adsorção realizados em PEVA-IDA-Ni(II) a diferentes temperaturas em presença dos tampões Tris-HCl 25 mM e Tris-HCl 25 mM, 1 M NaCl, ambos a pH 7,0.

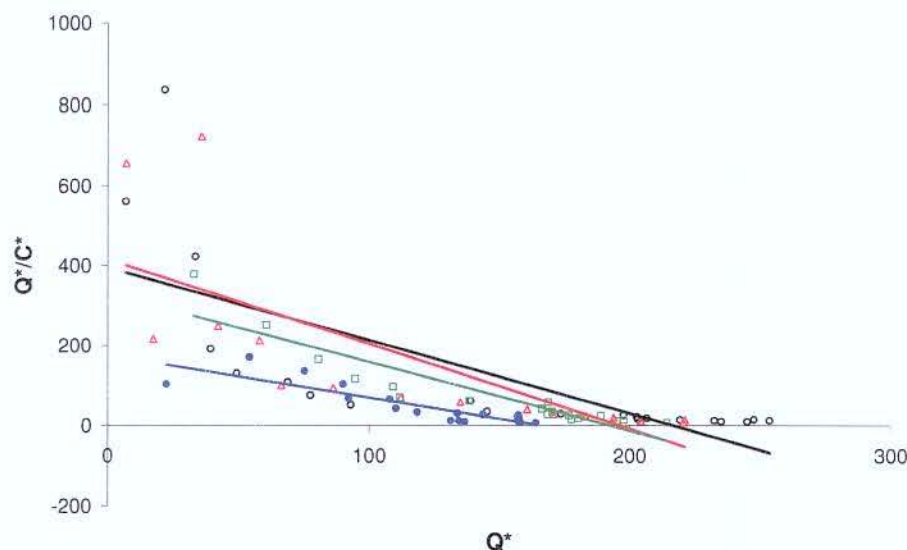


Figura K.1: Gráfico de Scatchard para os dados de adsorção de IgG humana em pré-purificada em presença do tampão Tris-HCl 25 mM pH 7,0 em membranas de PEVA-IDA-Ni(II) (○) 4°C ($R^2 = 0,52$), (△) 15 °C ($R^2 = 0,56$), (□) 25°C ($R^2 = 0,81$), (●) 37°C ($R^2 = 0,84$).

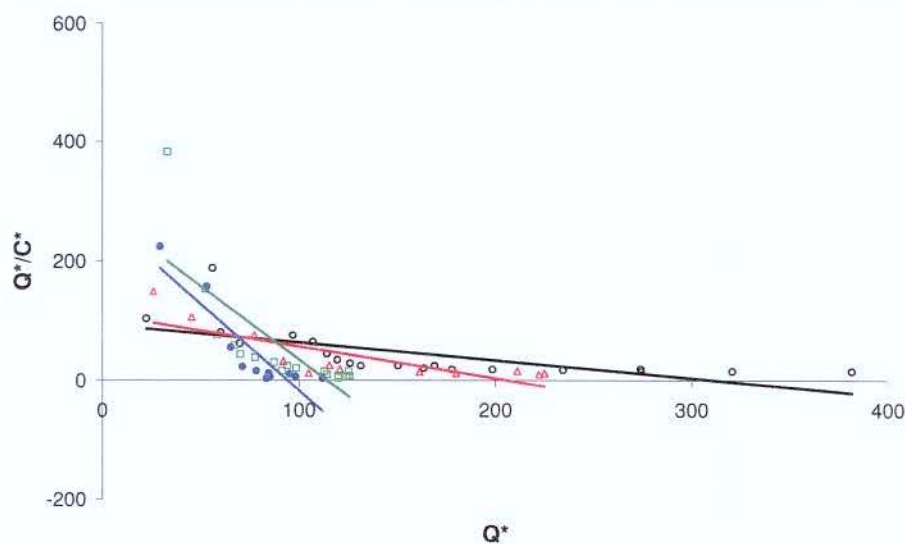


Figura K.2: Gráfico de Scatchard para os dados de adsorção de IgG humana em pré-purificada em presença do tampão Tris-HCl 25 mM 1 M NaCl pH 7,0 em membranas de PEVA-IDA-Ni(II): (○) 4°C ($R^2 = 0,44$), (△) 15°C ($R^2 = 0,64$), (□) 25°C ($R^2 = 0,58$), (●) 37°C ($R^2 = 0,79$).

ANEXO L

Cromatogramas dos experimentos realizados em Agarose-Proteína A e agarose-Proteína G em presença do tampão fosfato de sódio 25 mM pH 7,0. Eluição: glicina pH 3,0.

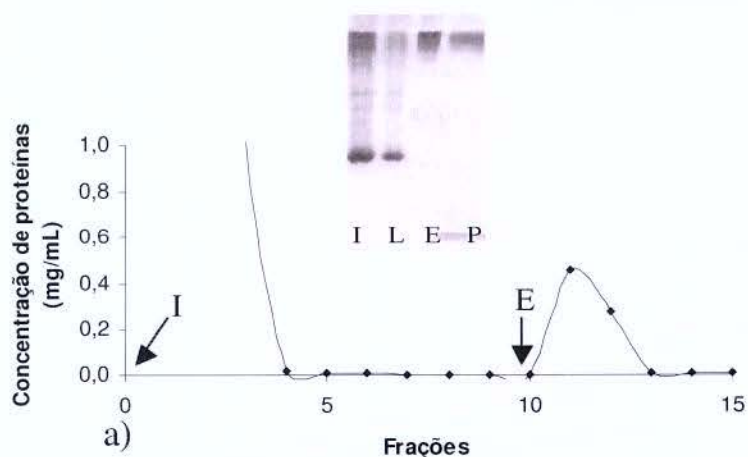


Figura L.1: Cromatografia de plasma diluído 1: 5 em Agarose-Proteína A utilizando-se o tampão de adsorção fosfato de sódio 25 mM pH 7,0. M - marcador de alta massa molecular; I - injeção; L- lavagem; E - eluição; P: IgG de alta pureza Aventis.

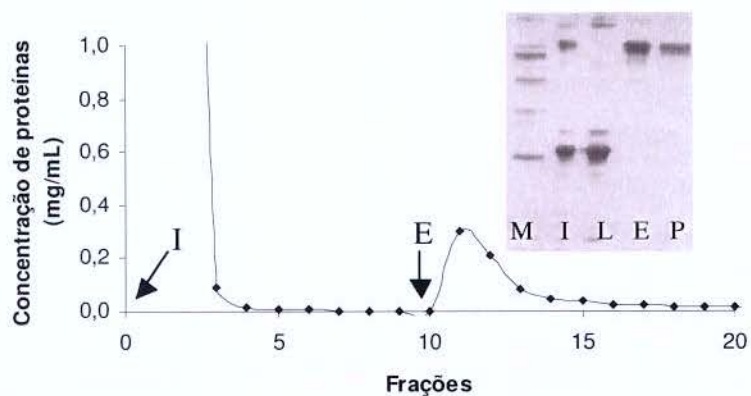


Figura L.2: Cromatografia de plasma diluído 1: 5 em Agarose-Proteína G utilizando-se o tampão de adsorção Fosfato de sódio 25 mM pH 7,0. M - marcador de alta massa molecular; I - injeção; L- lavagem; E - eluição; P: IgG de alta pureza Aventis.

ANEXO M

Balanco de massa dos experimentos realizados em *Aragore-proteína A* e *Agarose-Proteína G* em presença do tampão Fosfato 25 mM pH 7,0 referentes aos cromatogramas do Anexo L. Eluição: glicina pH 3,0.

Tabela M.1: Balanco de massa para proteína total, IgG, IgA, IgM, transferrina e albumina humana. Adsorção em agarose-proteína A. Tampão de adsorção: fosfato 25 mM, pH 7,0.

		PT ¹	IgA ²	IgG ³	IgM ⁴	HSA ⁵	TRF ⁶	IgG/ PT (mg/mg)	Fator de purificação
Injeção	(mg)	15,9	0,34	3,44	0,50	10,22	0,71	0,22	1,00
	(%)	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0		
Lavagem	(mg)	14,56	0,26	bt ⁷	0,24	10,08	0,79	0,00	0,00
	(%)	91,57	86,67	0,00	0,48	98,63	111,27		
Eluição	(mg)	3,80	bt ⁷	3,35	0,22	bt ⁷	bt ⁷	0,88	4,00
	(%)	23,90	0,00	97,38	0,44	0,00	0,00		
Recuperação	(mg)	18,36	0,26	3,35	0,46	10,08	0,70	0,88	4,00
	(%)	115,5	86,67	97,38	0,92	98,63	111,27		

¹ PT, Proteína Total, dosagem pelo método de Bradford, 1975, ² IgA, imunoglobulina A, dosagem por nefelometria, ³ IgG, imunoglobulina G, dosagem por nefelometria, ⁴ Imunoglobulina M, dosagem por nefelometria, ⁵ HSA, albumina do soro humano, dosagem por nefelometria, ⁶ TRF, transferrina, dosagem por nefelometria, ⁷bt, abaixo do limite detectável

Tabela M.2: Balanco de massa para proteína total, IgG, IgA, IgM, transferrina e albumina humana. Adsorção em agarose-proteína G. Tampão de adsorção: fosfato 25 mM, pH 7,0.

		PT ¹	IgA ²	IgG ³	IgM ⁴	HSA ⁵	TRF ⁶	IgG/ PT (mg/mg)	Fator de purificação
Injeção	(mg)	17,34	0,35	4,04	0,58	10,48	0,80	0,23	1,00
	(%)	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0		
Lavagem	(mg)	15,02	0,41	0,03	0,55	12,04	0,92	0,00	0,00
	(%)	86,62	117,71	0,74	94,83	114,89	115,0		
Eluição	(mg)	3,6	bt ⁷	3,45	0,05	bt ⁷	bt ⁷	0,96	4,17
	(%)	20,76	0,00	85,40	8,62	0,00	0,00		
Recuperação	(mg)	18,62	0,41	3,48	0,6	12,04	0,92	0,96	4,17
	(%)	107,38	117,71	86,14	103,45	114,89	115,0		

¹ PT, Proteína Total, dosagem pelo método de Bradford, 1975, ² IgA, imunoglobulina A, dosagem por nefelometria, ³ IgG, imunoglobulina G, dosagem por nefelometria, ⁴ Imunoglobulina M, dosagem por nefelometria, ⁵ HSA, albumina do soro humano, dosagem por nefelometria, ⁶ TRF, transferrina, dosagem por nefelometria, ⁷bt, abaixo do limite detectável

ANEXO N

O volume de membranas (V) e o volume intersticial (V_I) calculado para o mini-módulo corresponde a $0,248 \text{ cm}^3$ e $0,198 \text{ cm}^3$, respectivamente. Para o módulo comercial, a área superficial estimada pelo fabricante (Kuraray, Japão) ($A_{\text{comercial}}$) corresponde a 2 m^2 (10^4 cm^2) de área, o volume das membranas deste módulo ($V_{\text{comercial}}$) pode ser calculado como:

$$V_{\text{comercial}} = \frac{V_{\text{cm}^3} \cdot A_{\text{comercial}} \text{cm}^2}{A \text{cm}^2}$$

$$V_{\text{comercial}} = \frac{0,248 \text{ cm}^3 \cdot 10^4 \text{ cm}^2}{113 \text{ cm}^2}$$

Ou seja, o volume das membranas e o volume intersticial deste módulo é:

$$V_{\text{comercial}} \sim 44 \text{ mL}$$

$$V_{\text{Icomercial}} \sim 35,2 \text{ mL} (V_{\text{comercial}} * 0,8)$$

Para os tempos de residências iguais a 23, 9 e 17,1 segundos, a vazão de filtrado corresponde, para os módulos comerciais a Q_F igual a 88,4 e 123,5 mL/min